

(19) 日本特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-507931

(P2001-507931A)

(43) 公表日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

【特許請求の範囲】

1. ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼからなる群より選択されるリグナン生合成経路から単離されたタンパク質であって、ここで、該単離されたタンパク質がビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼである場合、該単離されたタンパク質が少なくとも50nmol⁻¹mg⁻¹の酵素活性を有する、単離されたタンパク質。

2. ディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

3. Forsythiaからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

4. Forsythia intermediaからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項3に記載の単離されたタンパク質。

5. Tsugaからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

6. Tsuga heterophyllaからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項5に記載の単離されたタンパク質。

7. Thujaからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項2に記載の単離されたタンパク質。

8. Thuja plicataからのディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求項7に記載の単離されたタンパク質。

9. 配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるディリジェントタンパク質の生物学的活性を有する、請求1に記載の単離されたタンパク質。

10. ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

11. Forsythiaからのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

12. Forsythia intermediaからのビノレシノール/ラリシレシノールレダクター

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	チーコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
1/15		1/15	
1/19		1/19	
1/21		1/21	
5/10		9/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全100頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-521816	(71) 出願人	ワシントン ステート ユニバーシティ
(86) (22) 出願日	平成9年11月7日 (1997.11.7)	リサーチ ファウンデーション	
(85) 優先権主張日	平成11年5月10日 (1999.5.10)	アメリカ合衆国 ワシントン 80184-	
(86) 国際出願番号	PCT/US97/20391	1802, プルマン, イーストゲート プール	
(87) 国際公開番号	WO98/20113	パード エス. イー. 1815	
(87) 国際公開日	平成10年5月14日 (1998.5.14)	レウイス, ノーマン ジー.	
(31) 優先権主張番号	60/030, 622	アメリカ合衆国 ワシントン 80183, プ	
(32) 優先日	平成8年11月8日 (1996.11.8)	ルマン, エス. イー. アバー ドライブ	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	1710	
(31) 優先権主張番号	60/054, 380	(74) 代理人 弁護士 山本 秀真	
(32) 優先日	平成9年7月31日 (1997.7.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織スベノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ、組織スベディリジェントタンパク質、および使用方法

(57) 【要約】
ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼは、Forsythia intermedia, Thuja plicata, およびTsuga heterophyllaから、これらの種からのディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAとともに分離されている。従って、ディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼは、少なくとも一部に同様の配列を有する、単離されたDNA配列が提供される。他の局面において、ディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼは、少なくとも一部に同様の配列を有する、単離されたDNA配列が提供される。DNAもしくはRNAの一部に十分に同様の配列を有する、それらとハイブリダイゼーションを可能にする塩基配列をコードする、複製可能組織スベノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの例として、ポリメラーゼ連鎖反応プライマーとして、あるいはディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする遺伝子または阻害遺伝子のためのプローブとして有用である。アンチセンスディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼcDNA、または組織的なディリジェントタンパク質もしくはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのDNAアライメント)。なお他の局面において、組織スベノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼは、組織スベノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNA配列で、形質転換され、トランスフェクトされ、感染され、そして/または注入された、改変された宿主細胞が提供される。従って、その後の使用のための有意な量の組織スベディリジェントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの産生、単離、および精製を容易にし、リグナン生合成を増強または他の宿主で改変するために細胞中のディリジェントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現または増強した発現を得るために使用され得るか、あるいはディリジェントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの阻害または発現のために他の宿主で利用され得る、ディリジェントタンパク質および/またはビノ

ーゼの生物学的活性を有する、請求項11に記載の単離されたタンパク質。

13. *Tsuga* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

14. *Tsuga heterophylla* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項13に記載の単離されたタンパク質。

15. *Thuja* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項10に記載の単離されたタンパク質。

16. *Thuja plicata* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項15に記載の単離されたタンパク質。

17. 配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有する、請求項1に記載の単離されたタンパク質。

18. ディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

19. *Forsythia* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

20. *Forsythia intermedia* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項19に記載のヌクレオチド配列。

21. 配列番号13または配列番号15の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

22. 配列番号13または配列番号15のアミノ酸配列をコードする、請求項19に記載の単離されたヌクレオチド配列。

23. 配列番号12または配列番号14の配列を有する、請求項19に記載の単離されたヌクレオチド配列。

24. *Tsuga* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

25. *Tsuga heterophylla* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項24に記載のヌクレオチド配列。

26. 配列番号17または配列番号19の生物学的活性を有するタンパク質をコード

する、単離されたヌクレオチド配列。

27. 配列番号17または配列番号19のアミノ酸配列コードする、請求項24に記載の単離されたヌクレオチド配列。

28. 配列番号16または18の配列を有する、請求項24に記載の単離されたヌクレオチド配列。

29. *Thuja* 種からのディリジエントタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

30. *Thuja plicata* からのディリジエントタンパク質をコードする、請求項29に記載のヌクレオチド配列。

31. 配列番号21、23、25、27、29、31、33、または35のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

32. 配列番号21、23、25、27、29、31、33、または35のいずれか1項に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項29に記載の単離されたヌクレオチド配列。

33. 配列番号20、22、24、26、28、30、32、または34のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項29に記載の単離されたヌクレオチド配列。

34. *Forsythia* 種からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

35. *Forsythia intermedia* からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項34に記載のヌクレオチド配列。

36. 配列番号48、50、52、54、56、または58のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

37. 配列番号48、50、52、54、56、または58のいずれか1項に記載のアミノ酸配列コードする、請求項34に記載の単離されたヌクレオチド配列。

38. 配列番号47、49、51、53、55、または57のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項34に記載の単離されたヌクレオチド配列。

39. *Thuja* 種からのピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

40. *Thuja plicata*からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項39に記載のヌクレオチド配列。

41. 配列番号62、64、66、または68のいずれか1項に記載の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

42. 配列番号62、64、66、または68のいずれか1項に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項39に記載の単離されたヌクレオチド配列。

43. 配列番号61、63、65、または67のいずれか1項に記載の配列を有する、請求項39に記載の単離されたヌクレオチド配列。

44. *Tsuga*種からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、単離されたヌクレオチド配列。

45. *Tsuga heterophylla*からのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする、請求項44に記載のヌクレオチド配列。

46. 配列番号70または配列番号72の生物学的活性を有するタンパク質をコードする、単離されたヌクレオチド配列。

47. 配列番号70または配列番号72のアミノ酸配列をコードする、請求項44に記載の単離されたヌクレオチド配列。

記載の単離されたヌクレオチド配列。

48. 配列番号69または配列番号71の配列を有する、請求項44に記載の単離されたヌクレオチド配列。

49. 配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるディリジエントタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能発現ベクター。

50. 配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能発現ベクター。

51. 請求項49に記載のベクターを含む、宿主細胞。

52. 請求項50に記載のベクターを含む、宿主細胞。

53. 適切な宿主細胞においてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ

の発現を増強する方法であって、該宿主細胞に、配列番号48、50、52、54、56、58、62、64、66、68、70、および72からなる群より選択されるタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

54. 適切な宿主細胞においてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現を改変する方法であって、該宿主細胞に、配列番号47、49、51、53、55、57、61、63、65、67、69、および71からなる群より選択される核酸分子の全てまたは一部に相補的であるRNAを発現するヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

55. 適切な宿主細胞においてディリジエントタンパク質の発現を増強する方法であって、該宿主細胞に、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、および35からなる群より選択されるタンパク質の生物学的活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

56. 適切な宿主細胞においてディリジエントタンパク質の発現を改変する方法であって、該宿主細胞に、配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、および34からなる群より選択される核酸分子の全てまたは一部に相補的であるRNAを発現するヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程を包含する、方法。

57. 光学的に純粋なリグナンを産生する方法であって、光学的に純粋なリグナンを産生するために、二分子フェノキシカブリング反応を指向し得るディリジエントタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを宿主細胞に導入する工程、および該光学的に純粋なリグナンを該宿主細胞から精製する工程を包含する、方法。

58. 前記ヌクレオチド配列が、配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、および34からなる群より選択される、請求項57に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

組換えビノレスシノール／ラリシノールレダクターゼ、

組換えディリジエントタンパク質、および使用方法

発明の分野

本発明は、*Forsythia intermedia*, *Tsuga heterophylla*, および *Thuja plicata* から単離されたディリジエント (difrigent) タンパク質およびビノレスシノール／ラリシノールレダクターゼ、*Forsythia intermedia*, *Tsuga heterophylla*, および *Thuja plicata* からのディリジエントタンパク質およびビノレスシノール／ラリシノールレダクターゼをコードする核酸配列、ならびにそれらの配列を含むベクター、それらの配列を含む宿主細胞、および組換えビノレスシノール／ラリシノールレダクターゼ、組換えディリジエントタンパク質、およびそれらの改変体を生成する方法に関する。

発明の背景

リグナンは、広い範囲の生理学的機能および薬理学的に重要な特性を有する、巨大な構造多様性クラスの維管束植物代謝物である (Ayres, D. C., および Lolike, J. D., *Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Lignans, Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, Cambridge, England (1990); Lewis, R., *Chemistry of the Amazon, Biodiversity Natural Products and Environmental Issues*, 588, (P. R. Seidl, O. R. Gottlieb および M. A. C. Kaplan) 135-167, ACS Symposium Series, Washington D. C. (1995)). それらの明白な抗生物質特性 (Markkanen, T. R., *Drugs Exptl. Clin. Res.* 7: 711-718 (1981)), 抗酸化剤特性 (Fauré, M. R., *Phytochemistry* 29: 3773-3775 (1990); Osa, T. R., *Agric. Biol. Chem.* 49: 3351-3352 (1985)), および摂食抑制物質特性 (H. amantha, J., および Nawrot, J., *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 95-98 (1984)) のために、維管束植物におけるリグナンの主な役割は、種々の日和見性生物学的病原体および捕食動物に対する抵抗性を付与するのを補助することである。リグナンはまた、

サイトカインとして (Birns, A. N. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 980-984 (1987))

7)), および木化における中間体として (Rahman, M. M. A. R., *Phytochemistry* 29: 1861-1866 (1990)) 提唱されており、これは、植物生長および発生における重要な役割を示唆する。生化学経路のリグニン／リグナンへの同化作用およびフェニルアラニンからの関連基質 (チロシン) は、水生植物のそれらの維管束乾燥地帯対応物への首尾良い変異 (transition) (Lewis, N. G., および Davin, L. B., *Isoprenoids and Other Natural Products, Evolution and Function*, 562 (W. D. Nes, 編) 202-246, ACS Symposium Series: Washington, DC (1994))、4 億 8000 年前のいくつか (Graham, L. E., *Origin of Land Plants*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1993)) に必須であったことが、幅広く支持される。

存在する化学分類学的データに基づいて、リグナンは、シダ類 *Blechnum orientale* (Wada, H. R., *Chem. Pharm. Bull.* 40: 2099-2101 (1992)) および マツモ (例えば、*Dendroceros japonicus* および *Megaceros flagellaris*) (Takeda, R. R., *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, 第 29 巻 (Zinsmeister, H. D., および Mures, R. 編) 201-207 頁, Oxford University Press: New York, NY (1990)) ; Takeda, R. R., *Tetrahedron Lett.* 31: 4159-4162 (1990)) のような「原始」植物において存在し、シシル紀に発生するとして最近分類されている (Graham, L. E., *J. Plant Res.* 109: 241-252 (1996))。興味深いことに、裸子植物および被子植物の両方の進化は、リグナンの構造複雑性および酸化改変における主な変化によって達成された (Lewis, N. G., および Davin, L. B., *Isoprenoids and Other Natural Products, Evolution and Function*, 562 (W. D. Nes, 編) 202-246, ACS Symposium Series: Washington, DC (1994); Gottlieb, O. R., および Yoshida, M., *Natural Products of Woody Plants, Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall* (Rowe, J. W., および Kirk, C. H. 編) 439-511 頁, Springer Verlag: Berlin (1989))。実際は、*Western Red Cedar (Thuja plicata)* のようないくつかの種において、リグナンは心材色、質、芳香、および耐久性を増強することによって、心材形成／作製に広範に寄与し得る。

植物におけるそれらの機能に加えて、リグナンはまた、重要な薬理学的役割を有する。例えば、ボドフィロトキシンは、そのエトポシドおよびテニオシド (te

niposide) 誘導体と同様に、抗ガン剤として首尾よく使用されている植物化合物の例である (Ayres, D.C., および Loike, J.D. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Lignans*, Chemical, Biological and Clinical Properties, Cambridge University Press, Cambridge, England (1990))。抗ウイルス特性はまた、選択されたリグナンについて報告されている。例えば、(-)-アークタイゲニン (arcligenin) (Schröder, H.C.ら, *Z. Naturforsch.* 45c, 1215-1211 (1990))、(-)-トラシエロゲニン (trachelogenin) (Schröder, H.C.ら, *Z. Naturforsch.* 4

5c, 1215-1211 (1990))、およびノルヒドログアヤレン酸 (nordihydroguaiaretic acid) (Gnabre, J.N.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11239-11243 (1995)) は、それらの明白な逆転写酵素阻害活性に起因して、HIVに対して各々有効である。いくつかのリグナン (例えば、マタイレジノール (matiresinol) (Nikaido, T.ら, *Chem. Pharm. Bull.* 29:3586-3592 (1981)) は、cAMPホスホジエステラーゼを阻害する一方、他は、心血管活性を増強する (例えば、シリリゲレジンール (Syriingaresinol) β -D-グルコシダーゼ) (Nishibe, S.ら, *Chem. Pharm. Bull.* 38:1763-1765 (1990))。また、常食における、高繊維常食の消化後に形成される「哺乳動物」リグナンまたは「フィトエストロゲン」、エンテロラクトン (enterolactone) およびエンテロジオール (enterodiol) の存在と、乳ガンおよび前立腺ガンの減少した発生率との間の高い相関関係が存在する (いわゆる、化学防御) (Avelson, M., および Setchell, K.D.R., *FEBS Lett.* 123:337-342 (1981); Adlercreutzら, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41:3-8 (1992); Adlercreutzら, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52:97-103 (1995))。「哺乳動物リグナン」は、順に、マタイレジノールおよびセコイソラリシレシノール (secoisolaricresinol) のようなリグナンに由来すると考えられる (Borrielloら, *J. Applied Bacteriol.*, 58:37-43 (1985))。

リグナンへの生合成経路は、リグナン生合成経路に関与する酵素または遺伝子の単離の先行技術の報告が存在しないが、現在定義されているところである。Forsythia intermediataからの粗酵素抽出物に関する放射性標識実験に基づいて、8, 8' 結合リグナン (これは、公知のほとんどの一般的なジリグノール (diliganol) 結合 (Davlin, L.B., および Lewis, N.G., *Rec. Adv. Phytochemistry*, 第26巻 (Staffo

rd, H.A., および Ibrahim, R.K. 編)、325-375頁、Plenum Press, New York, NY (1992)) を示す) への侵入が、2つのアキラルコニフェリルアルコール分子の立体選択的カップリングを介して、酸化化フリーラジカルの形態において生じ、フロフラン (furofuran) リグナン (+)-ビノレシノールを産出することが最初に確認された (Davlin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T., および Lewis, N.G., *Phytochemistry* 31:3869-3874 (1992); Paré, P.W.ら, *Tetrahedron Lett.* 35:4731-4734 (1994)) (図1)。

二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (例えば、フロフランリグナン (+)-ビノレシノールを産出する、2つのアキラルコニフェリルアルコール分子の立体選択的カップリング) には、多数の生物学的プロセスに関与する。これらは、維管束植物におけるリグニン形成 (M.Noseら, *Phytochemistry* 39:71 (1995))、維管束植物におけるリグナン形成 (N.G.Lewis および L.B.Davlin, *ACS Symp. Ser.* 562:202 (1994); P.W.Paréら, *Tetrahedron Lett.* 35:4731 (1994))、維管束植物におけるスベリン形成 (M.A.Bernardsら, *J. Biol. Chem.* 270:7382 (1995))、其菌における子実体発生 (J.D.Bu'Lockら, *J. Chem. Soc.* 2085 (1962))、昆虫クチクラメラニン沈着および硬化 (M.Miessnerら, *Helv. Chim. Acta* 74:1205 (1991); V.J. Marimónら, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31:119 (1996))、アブラムシ色素の形成 (D.W.Cameron および Load Todd, *Organic Substances of Natural Origin. Oxidative Coupling of Phenols*, W.I. Taylor および A.R. Battersby 編 (Dekker, New York, 1967) 第1巻, 203頁)、および藻類細胞壁ポリマーの形成 (M.A. Ragan, *Phytochemistry* 23:2029 (1984)) を含むと推定される。

前述のリグニンおよびリグナン基質のインビボでの生合成において観察される顕著な位置化学 (regiochemical) および/または立体化学的特異性とは対照的に、全ての以前に記載の化学的インビトロ二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (J. Iqbalら, *Chem. Rev.* 94:519 (1994)) および酵素的インビトロ二分子フェノキシラジカルカップリング反応 (K. Freudenberg, *Science* 148:595 (1965)) は、厳密な位置特異的制御および立体特異的制御を欠如している。すなわち、キラル中心が、インビトロでのカップリングの間に導入される場合、産物はラセミ体であり、そして1つより多い潜在的カップリング部位が存在する場合、異な

位置化学が生じ得る。従って、特定の鏡像異性形態またはインビトロでの特異的カップリング産物を生じる能力は、明白な制御下ではない。結果的に、二分子フエノキシラジカルカップリング反応の位置化学および立体化学を制御して、例えばリグナンの形成を導くという機構がインビボで存在することが推測される。

Forsythia intermedia、およびおそらく他の種において、(+)-ビノレシニノール(2つのE-コニフェリルアルコール分子の立体特異的カップリングの産物)は、逐次還元を受けて、(+)-ラリシレシニノール、次いで(-)-セコイソラリシレシニノールを生じる(Katayama, T.ら, Phytochemistry 32:581-591(1993); Chu, A.ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993)) (図1)。今までは、1つより多いレダクターゼが、逐次工程を触媒するのに必要とされるか否かは不明であったが、還元は、NaOHのプロR水素化物の抽出を介して進行し、産物 (+)-ラリシレシニノールおよび(-)-セコイソラリシレシニノールのC-7およびC-7'位置の両方で立体配置の「反転」を生じた(Chu, A.ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993))。(-)-マタイレジオールは、(-)-セコイソラリシレシニノールの脱水素化を介して続いて形成され、さらにその代謝はおそらく、Ipomoea cairicaにおける抗ウイルス(-)-トラシエログエンおよびPodophyllum peltatumにおける(-)-ポドフィロトキシンのようなリグナンを産出する。

従って、(+)-ビノレシニノールの立体特異的形成、ならびに(+)-ラリシレシニノールおよび(-)-セコイソラリシレシニノールを生じる続く還元工程は、リグナン代謝における中継点である。なぜなら、それらは、フラノ、ジベンジルブタン、ジベンジルブチロラクトン、およびアリールテトラヒドロナフトランリグナンサブクラスへの侵入を示すからである。さらに、リグナンは通常、光学活性であるが、存在する特定の鏡像異性体は、植物種の間で異なり得ることに注意するべきである。例えば、(-)-ビノレシニノールは、Xanthoxylum alanthoidesにおいて生じ(Ishiiら, Yakugaku Zasshi 103:279-292(1983))、そして(-)-ラリシレシニノールは、Daphne tanguticaにおいて存在する(Lin-Cenら, Planta Medica, 45:172-176(1982))。特定のリグナンの光学活性は、生物学的活性に関する重要な結果

を有し得る。例えば、(-)-トラシエログエンは、HTV-1のインビトロ複製を阻害し、一方、(+)-鏡像異性体は、あまり有効ではない(Schroderら, Naturforsch. h, 45c:1215-1211(1990))。

発明の要旨

前述に従って、本発明の1つの局面において、78kDディリジエントタンパク質が、8,8'-結合リグナン形成における立体特異性を付与することに関与することが、今や発見された。このタンパク質は、検出可能な触媒活性酸化中心を有せず、そして明らかに、コニフェリルアルコール由来フリーラジカルへの結合および配向のみに供し、これは、次いで、立体選択的なカップリングを受け、(+)-ビノレシニノールを形成する。フリーラジカルの形成は、最初の場合には、非特異的オキシダーゼまたは非酵素的電子酸化剤のいずれかの酸化許容量を必要とする。本発明の別の局面において、単一の酵素(ビノレシニノール/ラリシレシニノールレダクターゼと称される)は、ビノレシニノールからラリシレシニノール、次いでセコイソラリシレシニノールへの変換を触媒する。従って、本発明の1つの局面は、例えば、Forsythia intermedia, Thuja plicata、およびTsuga heterophyllaからのもののような、単離されたディリジエントタンパク質および単離されたビノレシニノール/ラリシレシニノールレダクターゼに関する。

本発明の他の局面において、Forsythia intermedia (配列番号12および14)、Thuja plicata (配列番号20、22、24、26、28、30、32、および34)、およびTsuga heterophylla (配列番号16および18)からのディリジエントタンパク質をコードするcDNAは、単離および配列決定されており、そして対応するアミノ酸配列は、推定されている。また、Forsythia intermedia (配列番号47、49、51、53、55、および57)、Thuja plicata (配列番号61、63、65、および67)、およびTsuga heterophylla (配列番号69および71)からのビノレシニノール/ラリシレシニノールレダクターゼをコードするcDNAは、単離および配列決定されており、そして対応するアミノ酸配列は、推定されている。

従って、本発明は、単離されたタンパク質、およびディリジエントタンパク質またはビノレシニノール/ラリシレシニノールレダクターゼの発現をコードする単離

されたDNA配列に関する。他の局面において、本発明は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼまたはディリジエントタンパク質をコードする核酸配

列を含む複製可能組換えクロロニンゲビヒクルに関する。本発明はまた、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼDNAまたはRNAの少なくとも一部、またはディリジエントタンパク質DNAまたはRNAの少なくとも一部に十分に相補的な、それらへのハイブリダイゼーションを可能にする塩基配列に関する。前述の相補的塩基配列は、以下を含むがこれらに限定されない：アンチセンスピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼRNA；アンチセンスディリジエントタンパク質RNA；ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼDNAまたはディリジエントタンパク質DNAに相補的なDNAのフラグメント、そしてこれらはそれゆえ、ポリメラーゼ連鎖反応プライマーとして、またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼ遺伝子、ディリジエントタンパク質遺伝子、もしくは関連遺伝子のためのプロンプとして有用である。

本発明のおお別の局面において、本発明の組換えクロロニンゲビヒクルおよび/またはDNA配列で形質転換され、トランスフェクトされ、感染され、そして/または注入された改変された宿主細胞が提供される。従って、本発明は、植物、動物、微生物、および細胞培養物におけるピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼおよびディリジエントタンパク質の組換え発現を提供する。本明細書中に記載される発明概念は、植物、動物、微生物、または細胞培養物における、有意な量の組換えピノレシノール/ラリシレシノールレダクタクターゼもしくはディリジエントタンパク質、またはそれらの酵素産物の産生、単離、および精製を容易にするために使用され得る。

図面の簡単な説明

本発明の前述の局面および多くの付随する利点は、添付する図面と組み合わせの場合、以下の詳細な説明を参照することによってより理解されるように、より容易に理解されるようになる、ここで：

図1は、Forsythia intermediaにおける、E-コニフェリアルアルコールの(+)-ピノレシノールへの立体特異的変換を示す。この反応の立体選択性は、ディリジ

エントタンパク質によって制御される。次いで、(+)-ピノレシノールは、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタクターゼによって、(+)-ラリシレシノール

ールおよび(-)-セコイソラリシレシノールに連続的に変換される。(+)ピノレシノール、(+)-ラリシレシノール、および(-)-セコイソラリシレシノールは、それぞれリグナンのプロフラン、フラノ、およびジベンジルブタン系統群の前駆体である。

好ましい実施態様の詳細な説明

本明細書中で用いられるように、用語「アミノ酸 (amino acid)」および「アミノ酸 (amino acids)」は、全ての天然に存在するL- α -アミノ酸またはその残基をいう。アミノ酸は、1文字表記または3文字表記のいずれかによって識別される。

Asp	D	アスパラギン酸	Ile	I	イソロイシン
Thr	T	スレオニン	Leu	L	ロイシン
Ser	S	セリン	Tyr	Y	チロシン
Glu	E	グルタミン酸	Phe	F	フェニルアラニン
Pro	P	プロリン	His	H	ヒスチジン
Gly	G	グリシン	Lys	K	リジン
Ala	A	アラニン	Arg	R	アルギニン
Cys	C	システイン	Trp	W	トリプトファン
Val	V	バリン	Gln	Q	グルタミン
Met	M	メチオニン	Asn	N	アスパラギン

本明細書中で用いられるように、用語「ヌクレオチド」は、DNAまたはRNAのモノマー単位をいい、これは、糖部分 (ペントース)、リン酸、および窒素塩素式塩基を含む。塩基は、グリコシド炭素 (ペントースの1'炭素) を介して糖部分に結合し、そして塩基および糖の組合せは、ヌクレオシドと称される。塩基は、アデニン (「A」)、グアニン (「G」)、シトシン (「C」)、およびチミン (「T」) であるDNAの4つの塩基で、ヌクレオチドを特徴づける。イノシン (「I」) は合成塩基であり、これは、4つの天然に存在する塩基 (A、C、G、

またはT)のいずれかを置換するのに使用され得る。4つのRNA塩基は、A、G、C、およびウラシル(「U」)である。本明細書中に記載されるヌクレオチド配

列は、隣接するペントースの3'炭素と5'炭素との間のホスホジエステル結合によって結合されるヌクレオチドの線状配列を含む。

用語「パーセント同一性」(%I)は、2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列が並行して配列される場合、同じ相対的位置を占有するアミノ酸またはヌクレオチドの割合を意味する。

用語「パーセント類似性」(%S)は、2つの比較タンパク質配列の関連性の程度の統計学的基準である。パーセント類似性は、コンピュータプログラムによって計算され、これは、化学的類似性(例えば、比較されるアミノ酸は、酸性、塩基性、疎水性、芳香族などであるか否か)、および/または塩基対変化の最小数によって測定されるような進化的距離(これは、比較されるアミノ酸の対の1つのメンバをコードするコドンに対する他のメンバをコードするコドンに交換するのに必要とされる)に基づくアミノ酸の各比較対に対する数値を割り当てる。計算は、2つの配列の最良適合アラインメントが全ての可能なアラインメントの反復比較によって経験的に作製された後、行われる。(Henikoff, S. および Henikoff, J. G., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992))。

「オリゴヌクレオチド」は、ホスホジエステル結合を介して結合したデオキシリボヌクレオチドの短い長さの一本鎖または二本鎖配列をいう。オリゴヌクレオチドは、公知の方法によって化学的に合成され、そして例えば、ポリアクリルアミドゲルで精製される。

用語「ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ」は、2つの還元反応: ビノレシノールのラリシレシノールへの還元、およびラリシレシノールのセコインラリシレシノールへの還元を触媒し得る酵素を意味するように、本明細書中使用される。これらの反応の産物(ラリシレシノールおよびセコインラリシレシノール)は、(+)または(-)鏡像異性体のいずれかであり得る。

用語「ディリジエントタンパク質」は、二分子フェノキシラジカルカップリン

グ反応を先導し、それにより反応の産物および/またはそのポリマー誘導体の難立体化学および位置化学を決定し得るタンパク質を意味するように、本明細書中使用される。

用語「改変」、「アミノ酸配列改変」、「改変体」、および「アミノ酸配列改

変体」は、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと比較して、それらのアミノ酸配列においていくつかの相違を有するディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ分子をいう。通常は、改変体は、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと少なくとも約70%の相同性を有し、そして好ましくは、対応する天然のディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼと少なくとも約80%相同性である。本発明内にあるディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列改変体は、特定の位置での置換、欠失、および/または挿入を有する。ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの配列改変体は、所望の増強または減少された酵素活性、改変された位置化学または立体化学、あるいは改変された基質利用性または産物分布を達成するために使用され得る。

置換ディリジエントタンパク質改変体またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ改変体は、除去された対応する天然のディリジエントタンパク質配列またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ配列における少なくとも1つのアミノ酸残基、および同じ位置でのその位置において挿入された異なるアミノ酸を有するものである。置換は単一であり得、ここで分子中の1つのアミノ酸のみが置換されているか、または複数であり得、ここで同じ分子中の2つ以上のアミノ酸が置換されている。ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ分子の活性における置換変化は、天然のアミノ酸の側鎖と、電荷および/または構造において有意に異なる側鎖を有するアミノ酸の置換によって得られ得る。この型の置換は、ポリペプチド骨格の構造および/または置換の領域における分子の電荷もしくは疎水性に影響を及ぼすこと

が予測される。

ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の活性における穏和な変化は、天然の分子の側鎖と電荷および/または構造において類似である側鎖を有するアミノ酸の置換によって予測される。この型の置換（保存的置換といわれる）は、ポリペプチド骨格の構造または置換の領域における分子の電荷もしくは疎水性のいずれかを実質的に変更させないと予測される。

挿入ディリジエントタンパク質改変体またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ改変体は、天然のディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子における特定の位置でアミノ酸のすぐ隣に挿入される1つ以上のアミノ酸を有するものである。アミノ酸のすぐ隣は、そのアミノ酸の α カルボキシまたは α アミノ官能基のいずれかに結合されることを意味する。挿入は、1つ以上のアミノ酸であり得る。通常は、挿入は、1つまたは2つの保存的アミノ酸からなる。挿入の部位に隣接するアミノ酸に、電荷および/または構造において類似のアミノ酸は、保存的として定義される。あるいは、本発明は、挿入の部位に隣接するアミノ酸とは実質的に異なる電荷および/または構造を有するアミノ酸の挿入を含む。

欠失改変体は、天然のディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子における1つ以上のアミノ酸が除去されているものである。通常は、欠失改変体は、ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の特定の領域において欠失した1つまたは2つのアミノ酸を有する。

用語「アンチセンス」または「アンチセンスRNA」または「アンチセンス核酸」は、メッセンジャーRNA分子の全てまたは一部に相補的である核酸分子を意味するように、本明細書中で使用される。アンチセンス核酸分子は、代表的には、相補的な発現されるメッセンジャーRNA分子のインピボでの発現を阻害するため使用される。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子に関して使用される場合、以下の実施例8に記載されるアッセイのような酵素活性アッセイにおいて測定されるような、ピノレシノールおよびラリシレシノールを還元して、それぞれラリシレシノールおよびセコイソラリシレシノールを得る、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼのディリジエントタンパク質またはピノレシノールレダクタゼの、所望の改変された生物学的活性を有し得、これは、例えば、改変された反応速度論、基質利用性、産物分布、または位置化学および立体化学のような他の特徴を含む。

用語「コードするDNA配列」、「コードするDNA」、および「コードする核酸」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、翻訳されたポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。従って、DNA配列は、アミノ酸配列をコードする。

用語「複製可能発現ベクター」および「発現ベクター」は、DNAの小片、通常は二本鎖をいい、これは、外来DNAの小片をそれに挿入されてい得る。宿主において天然には見いだされないDNAである外来DNAは、異種DNAとして規定される。

ベクターは、外来または異種DNAを適切な宿主細胞に転送するのに使用される。一旦宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAと独立的または同時に複製し得、そしてベクターおよびその挿入した（外来）DNAのいくつかのコピーが作製され得る。さらに、ベクターは、外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にする必要なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多くの分子は、迅速に合成され得る。

は、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子に関して使用される場合、以下の実施例8に記載されるアッセイのような酵素活性アッセイにおいて測定されるような、ピノレシノールおよびラリシレシノールを還元して、それぞれラリシレシノールおよびセコイソラリシレシノールを得る、ピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼ分子の能力をいう。

用語「生物学的活性」、「生物学的に活性な」、「活性」、および「活性な」は、ディリジエントタンパク質に関して使用される場合、二分子フェノキシラジカルカップリング反応を先導して、それにより反応の産物およびそのポリマー誘導体の立体化学および位置化学を決定するディリジエントタンパク質の能力をいう。

ディリジエントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼのアミノ酸配列改変体は、所望の改変された生物学的活性を有し得、これは、例えば、改変された反応速度論、基質利用性、産物分布、または位置化学および立体化学のような他の特徴を含む。

用語「コードするDNA配列」、「コードするDNA」、および「コードする核酸」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、翻訳されたポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。従って、DNA配列は、アミノ酸配列をコードする。

用語「複製可能発現ベクター」および「発現ベクター」は、DNAの小片、通常は二本鎖をいい、これは、外来DNAの小片をそれに挿入されてい得る。宿主において天然には見いだされないDNAである外来DNAは、異種DNAとして規定される。

ベクターは、外来または異種DNAを適切な宿主細胞に転送するのに使用される。一旦宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAと独立的または同時に複製し得、そしてベクターおよびその挿入した（外来）DNAのいくつかのコピーが作製され得る。さらに、ベクターは、外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にする必要なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多くの分子は、迅速に合成され得る。

用語「形質転換宿主細胞」、「形質転換された」、および「形質転換」は、DN Aの細胞への導入をいう。細胞は「宿主細胞」と称され、そして原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。代表的な原核生物宿主細胞としては、*E. coli*の種々の株が挙げられる。代表的な真核生物宿主細胞としては、植物細胞（例えば、トウモロコシ細胞）、酵母細胞、昆虫細胞、または動物細胞が挙げられる。導入されたDNAは、通常、DNAの挿入小片を含むベクターの形態である。導入されたDNA配列は、宿主細胞と同じ種由来、または宿主細胞とは異なる種由来であり得るか、またはハイブリッドDNA配列（いくつかの外來DNAおよび宿主種に由来するいくつかのDNAを含む）であり得る。

本発明に従って、*Forsythia intermedia*、*Thuja plicata*、および*Tsuga heterophylla*由来のディリジエントタンパク質およびピノレシノール/ラリシノールレダクタターゼをコードするcDNAが、以下の様式において、単離され、配列決定され、そして発現された。

*Forsythia intermedia*由来のディリジエントタンパク質をコードするcDNAに関連して、経験的に決定された精製プロトコルが開発されて、*Forsythia*ディリジエントタンパク質が単離された。この手順は、ディリジエントタンパク質の少なくとも6つのアイソフォームを生じた。これらのアイソフォームの各々のアミノ末端のアミノ酸配列決定は、各アイソフォームの配列が同一であることを示した。これらのアイソフォームの混合物のN末端の配列決定は、28アミノ酸配列を生じた（配列番号1）。これらアイソフォームの混合物のトリプシン消化は、6つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列番号2から7の配列決定を可能にするのに十分な量に精製された。

PSINT1（配列番号8）と称されるプライマーは、N末端ペプチド（配列番号1）のアミノ酸9～15の配列に基づいて合成された。PSIIR（配列番号9）と称されるプライマーは、（配列番号2）に示される内部ペプチド配列のアミノ酸3～9の配列に基づいて合成された。PSI2R（配列番号10）と称されるプライマーは、（配列番号2）に示される内部ペプチド配列のアミノ酸13～20の配列に基づいて合成された。PSI7R（配列番号11）と称されるプライマーは、（配列番号3）

に示される内部ペプチド配列のアミノ酸6～12の配列に基づいて合成された。

*Forsythia*全RNAは、大濃度のポリフェノールを含む木質組織のために特異的に設計された方法から改変されたプロトコルを用いて単離された。ポリA+RNAが単離され、そしてcDNAライブラリーが、標準的な手段を用いて構築された。ブライマー-PSINT1（配列番号8）およびPSI7R（配列番号11）、PSI2R（配列番号10）、またはPSIIR（配列番号9）のうちの1つを、基質としての*Forsythia* cDNAのアリコートとともに利用する各PCR反応は、それぞれ、約370bp、約155bp、および約125bpの単一のcDNAバンドを生じた。PSINT1（配列番号8）-PSI7R（配列番号11）

反応の約370bp産物は、PCRによって増幅され、そして*Forsythia intermedia* cDNAライブラリーの約600,000PFUをスクリーニングするためのプローブとして利用された。2つの別々のcDNAが同定され、pPSDFI1（配列番号12）およびpSDFI2（配列番号14）と命名された。ディリジエントタンパク質をコードするcDNAインサートは、プラスミドpPSDFI1から切り出され、そしてバキュロウイルス移入ベクターpBlueBac41にクローン化された。得られる構築物を使用して、*Spodoptera frugiperda*を形質転換し、そこから、機能的ディリジエントタンパク質を精製した。

*Thuja plicata*および*Tsuga heterophylla*由来のディリジエントタンパク質のクローニングに関連して、*Forsythia* cDNAが、*Tsuga heterophylla*からの2つのディリジエントタンパク質クローン（配列番号16、18）および*Thuja plicata*からの8つのディリジエントタンパク質cDNAクローン（配列番号20、22、24、26、28、30、32、34）を単離するためのプローブとして使用された。

*Forsythia intermedia*由来の(+)ピノレシノール/(+)ラリシノールレダクタターゼをコードするcDNAに関連して、経験的に決定された精製プロトコル（これは、8クロマトグラフィー工程からなる）が、*Forsythia*(+)-ピノレシノール/(+)ラリシノールレダクタターゼタンパク質を単離するために開発された。この手順は、(+)ピノレシノール/(+)ラリシノールレダクタターゼの2つのアイソフォームを生じ、これは両方とも、(+)ピノレシノールおよび(+)ラリシ

レシノールの還元を触媒し得た。これらのアイソフォーム各々のN-末端の配列決定は、同一の30アミノ酸配列 (配列番号36) を生じた。これらのアイソフォームの両方の混合物のトリブシン消化は、4つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列決定を可能にするのに十分な量で精製された (配列番号37~40)。さらに、これらのアイソフォームの両方の混合物の臭化シアニン切断は、3つのペプチドフラグメントを生じ、これらは、配列決定を可能にするのに十分な量で精製された (配列番号41~43)。

PLRN5 (配列番号44) と称されるプライマーは、N-末端ペプチドのアミノ酸7~13の配列 (配列番号36) に基づいて合成された。PLRL4R (配列番号45) と称されるプライマーは、配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸2~8の

配列に基づいて合成された。PLRL5R (配列番号46) と称されるプライマーは、配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列に基づいて合成された。配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列 (プライマー-PLRL5R (配列番号46) がそれに基づく) はまた、配列番号41に示される、臭化シアニンで作製した内部フラグメントのアミノ酸4~10の配列に対応した。

Forsythia全RNAは、大強度のポリフェノールを含む木質組織のために特異的に設計された方法から改変されたプロトコルを使用して単離された。ポリA+RNAが単離され、そしてcDNAライブラリーが、標準的な手段を用いて構築された。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびPLRL4R (配列番号45) またはPLRL5R (配列番号46) のいずれかを、基質としてのForsythia cDNAのアリコートとともに利用するPCR反応は、380bpおよび400bpの2つの増幅されたバンドを生じた。1つの400bp cDNAインサートは、Forsythia cDNAライブラリーをスクリーニングするためにプロープとして利用された。400bpプロープは、配列番号47の塩基22~423に対応した。6つのcDNAクローンが、単離されそして配列決定された (配列番号47、49、51、53、55、57)。これらのクローンは共通のコード領域を有し、多くは、異なる5'非翻訳領域およびそれぞれ異なる地点で終わる3'非翻訳領域を有した。これらのcDNA (配列番号47) のうちの1つは、E.coliにおいてβガラクトシダーゼ融合タンパク質として発現し、これは、天然の植物タンパク質として同じ鏡

像異性体特異的反応を触媒した。

(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼおよびThuja plicata由来の(-)-ビノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼのクロニンゲンに関連して、cDNAを合成し、そしてPCR反応におけるテンプレートとして利用した。ここでプライマーは、3'リンカープライマー (配列番号59) および5'プライマー (CR6-NTと称される) (配列番号60) であった。予測した長さ (1.2kb) の少なくとも2つのバンドが生成し、そしてプラスミドベクターにクローン化された。1つのクロニン (pTr-Tp1と称される) (配列番号61) が完全に配列決定され、そしてE.coliにおいてβガラクトシダーゼ融合タンパク質として発現された。pTr-Tp1は、(-)-ビノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼをコードする。

クロニンpTr-Tp1のcDNAインサートを使用して、T.plicata cDNAライブラリーがスクリーニングされ、そしてさらなる唯一のクロニン (pTr-Tp2と称される) (配列番号63) が同定された。pTr-Tp2はpTr-Tp1に高い相同性を有するが、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼをコードする。クロニンpTr-Tp1のcDNAインサートを使用して、T.plicata cDNAライブラリーがスクリーニングされ、そしてさらなる2つのビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼcDNA (配列番号65、67) が同定された。

Tsuga heterophylla由来のビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードする2つのcDNA (配列番号69、71) が、Tsuga heterophylla cDNAライブラリーをpTr-Tp1 cDNAインサートでスクリーニングすることによって単離された。

ディリジエントタンパク質、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼ、および(-)-ビノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAの単離は、これらの機能的酵素のための効率的な発現系の開発を可能にし；リダクション生成の発生的調節を検査するための有用なツールを提供し、そして他のディリジエントタンパク質およびビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの単離を可能にする。ディリジエントタンパク質およびビノレシノ

ール/ラリシレシノールレダクターゼcDNAの単離はまた、リグナン生合成を増強または改変するために、広範な生物の形質転換を可能にする。

本発明のタンパク質および核酸は、二分子フェノキシカップリング反応（例えば、フロフラン、フラノ、およびジベンジルブタンリグナン）の産物の立体化学、位置化学（regiochemistry）、またはその両方を予め決定するのに利用される。限定的でない例として、本発明のタンパク質および核酸は、以下のために利用される：植物種における糖常保護リグナン（例えば、ポドフィロトキシン）のレベルを上昇させるかまたはそうでなければ改変する（ここで、植物種は、野菜、穀物、および果実、ならびにこのような遺伝的に改変した植物由来の物質を取り込んだ食品を含むがこれらに限定されない）；植物種を遺伝的に改変して、種々の目的（例えば、ニュートラジェン-テイカルズ（nutraceuticals）および栄養補助食品）に有用なリグナンの豊富な天然の供給を提供する；所望の生物学的特性を有する光学的に純粋なリグナン（例えば、抗ウイルス特性を有する（-）-アル

アル

クテゲニン（arctigenin）の豊富な供給を産生するように生存生物を遺伝的に改変する。特に、ディリジェントタンパク質結合部位の特徴付けおよび作用の機構は、立体化学的に制御されたポリマーアセンブリのためのテンプレートとして働く一連（array）のディリジェントタンパク質結合部位からなる合成タンパク質の開発を可能にする。

当該分野で周知のN-末端輸送配列（例えば、von Heijne, G.ら、Eur. J. Biochem 180:535-545(1989)；Stryer, Biochemistry W.H. Freeman and Company, New York, NY, 769頁(1988)を参照のこと）は、種々の細胞または細胞外位置に、ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを指向させるのに使用される。

欠失、置換、変異、および/または挿入によって産生される得る、野生型ディリジェントタンパク質クロロニンならびにピノレシノール/ラリシレシノールクロロニンの配列改変体は、先行技術によって制限される範囲を除いて、本発明の範囲内であることが意図される。ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラ

リシレシノールレダクターゼアミノ酸配列改変体は、野生型ディリジェントタンパク質または野生型ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするDNA配列を、例えば、部位特異的変異誘発と通常呼ばれる技術を用いることにより変異させることによって構築され得る。現在、当該分野において周知である種々のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（例えば、ClontechのTransformer Site-Directed Mutagenesisキットのような2プライマー系）が、この目的のために使用され得る。

この系における様式的プラスミドの変性に続いて、2つのプライマーは、プラスミドに同時にアニールされる；これらのプライマーのうちの一方は、所望の部位特異的変異を含み、他方は、プラスミドにおける別の点での変異を含み、制限部位の排除を生じる。次いで、第2鎖合成が行われ、これらの2つの変異を強固に連結させ、そして得られるプラスミドは、E.coliのmutS株に形質転換される。プラスミドDNAは、形質転換細菌から単離され、問題の制限部位で制限され（これにより、非変異プラスミドは線状化される）、次いでE.coliに形質転換される。この系は、サブクロニングまたは一本鎖ファージミドの生成を必要とせずに、

発現プラスミドにおいて直接変異の生成を可能にする。2つの変異の強固な連結および概く非変異プラスミドの線状化は、高い変異効率を生じ、そして最小スクリーニングを可能にする。最初の制限部位プライマーの合成に続いて、この方法は、1変異部位あたり1つの新規なプライマー型のみの使用を必要とする。各位置変異体を別々に調製するよりはむしろ、「設計された縮重」オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、所定の部位で所望の変異の全てを同時に導入するため合成され得る。形質転換体は、変異された領域を通じてプラスミドDNAを配列決定して変異クロロニンを同定および選別することによってスクリーニングされ得る。次いで、各変異体DNAは制限され、そしてMutation Detection Enhancementゲル（J.T. Baker）で電気泳動することによって分析されて、配列に他の改変が生じていないことを（未変異誘発コントロールに対するバンドシフト比較によって）確認され得る。

検証した変異体二重鎖は、既にこの型のベクターにクロロニ化されていない

合、複製可能発現ベクターにクローン化され得、そして得られる発現ベクター構築物は、変異体タンパク質の高レベルの産生および純くそのタンパク質の精製のため、E.coli (例えば、E.coli BL21(DE3)pLysS株) を形質転換するために使用され得る。FAB-MSマッピングの方法は、変異体発現の正確さを迅速にチェックするために使用され得る。この技術は、全体タンパク質を通じてセグメントを配列決定することを提供し、そして配列の割り当てにおける必要な確信を提供する。この型のマッピング実験において、タンパク質はプロテアーゼで消化される(選択は、改変される特定領域に依存する。なぜなら、このセグメントが重要であり、そして残りのマップは未変異誘発タンパク質のマップと同一であるはずだからである)。切断フラグメントのセットは、微小孔(microbore) HPLC (逆相またはイオン交換、再度、改変される特異的領域に依存する) によって分離され、各々の画分においていくつかのペプチドを提供し、そしてペプチドの分子量は、FAB-MSによって決定される。次いで、質量は、予測配列の消化から予測したペプチドの分子量と比較され、そして配列の正確さが素早く確認される。タンパク質改変へのこの変異誘発アプローチが指向されるので、改変したペプチドの配列決定は、MSが予測と一致する場合、必要ではない。変化した残基を検証することが

必要な場合、CADタンデムMS/MSが使用されて、問題の混合物のペプチドを配列決定し得るか、または標的ペプチドが、改変の位置に依存して、計算エドマン分解またはカルボキシペプチダーゼY消化のために精製される。

特定の部位特異的変異の設計において、非保存的置換(例えば、Cys、HisまたはGluをAlaに)を最初に行い、そして活性が結果的に大きく損なわれるかどうかを決定することが一般的に所望され得る。次いで、変異誘発したタンパク質の特性は、改変した機能の感受性指標としての K_m および k_{cat} の速度パラメーターに対して特別の注意をもって試験され、改変した機能から、結合および/または触媒作用における変化自体は、天然の酵素に対する比較によって推定され得る。残基が、この手段によって、活性減損またはノックアウトによって重要であると実証される場合、保存的置換が行われ得る(例えば、側鎖の長さを改変するためのGI

uをAspに; CysをSerに、またはHisをArgに)。芳香族もまた、アルキル側鎖を置換され得るが、疎水性セグメントについては、改変されるのは主にサイズである。正常な産物分布における変化は、反応シーケンスのどの工程が、変異によって改変されているかを示し得る。

他の部位特異的変異誘発技術もまた、本発明のヌクレオチド配列とともに使用され得る。例えば、DNAの制限エンドヌクレアーゼ消化に続く連結は、Sambrookらの第15.3節に記載されるように、ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ欠失改変体を作製するのに使用され得る(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY (1989))。同様のストラテジーは、Sambrookら(前出)の第15.3節に記載されるように、挿入改変体を構築するのに使用され得る。

オリゴヌクレオチド特異的変異誘発もまた、本発明の置換改変体を調製するのに使用され得る。本発明の欠失および挿入改変体を簡単に調製するためにまた使用され得る。この技術は、Adelmanら(DNA 2:183(1983))によって記載されるように、当該分野で周知である。一般的には、少なくとも25ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが、ディリジェントタンパク質遺伝子またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ遺伝子において2つ以上のヌクレオチドを挿入、

欠失、または置換するために使用される。至適オリゴヌクレオチドは、変異をコードするヌクレオチドのどちらの側でも12~15の完全に一致したヌクレオチドを有する。野生型ディリジェントタンパク質または野生型ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを変異誘発するために、オリゴヌクレオチドは、適切なハイブリダイゼーション条件下で、一本鎖DNAテンプレート分子にアニールされる。次いで、DNA重合化酵素(通常は、E.coli DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント)が添加される。この酵素は、DNAの変異保有鎖の合成を完了するためプライマーとして、オリゴヌクレオチドを使用する。従って、ヘテロ二重鎖分子が形成され、その結果、DNAの1つの鎖は、ベクターに挿入された野生型ディリジェントタンパク質またはピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードし、そしてDNAの第2の鎖は、同じベクターに挿入されたディリジェント

タンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの変異形態をコードする。次いで、このヘテロ二重鎖分子は、適切な宿主細胞に形質転換される。

置換された1より多いアミノ酸を有する変異体は、いくつかの方法のうちの1つにおいて作製される。アミノ酸がポリペプチド鎖においてともに近接して位置する場合、それらは、所望のアミノ酸置換の全てをコードする1つのオリゴヌクレオチドを用いて、同時に変異される。しかし、アミノ酸が、互いにいくらか離れて位置する場合（例えば、10アミノ酸以上によって隔てられる）、所望の変化の全てをコードする単一のオリゴヌクレオチドを作製するのはより困難である。代わりに、2つの別の方法のうち1つが使用される。第1の方法においては、別々のオリゴヌクレオチドが、置換される各アミノ酸のために作製される。次いで、オリゴヌクレオチドは、一本鎖テンプレートDNAに同時にアニールされ、そしてテンプレートから合成されるDNAの第2鎖は、所望のアミノ酸置換の全てをコードする。

別の方法は、所望の変異体を生産するための2回以上の変異誘発を包含する。1回目は、単一の変異体について記載されるとおりである：野生型ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼDNAは、テンプレートのために使用され、第1の所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌ

クレオチドが、このテンプレートにアニールされ、そして次いで、ヘテロ二重鎖DNA分子が作製される。2回目の変異誘発は、1回目の変異誘発において産生した変異DNAをテンプレートとして利用する。従って、このテンプレートは既に、1つ以上の変異を含む。次いで、さらなる所望のアミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドが、このテンプレートにアニールされ、そしてDNAの得られる鎖は今や、一回目および2回目の変異誘発の両方からの変異をコードする。この得られたDNAは、3回目の変異誘発において、テンプレートとして使用され、この後同様に読み得る。

真核生物発現系は、ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ生産のために利用される。なぜなら、それらは、任意

の必要な翻訳後改変を行い得、そして適切な膜位置に酵素を指向させ得るからである。この目的のための代表的な真核生物発現系は、組換えバキュロウイルスAutographa californica核多核体ウイルス (AcNPV; M.D. SummersおよびG.E. Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (1986); Luckowら, Bio-technology 6:47-55 (1987)) を、本発明のディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現のために使用する。昆虫細胞（例えば、Spodoptera frugiperda種の細胞）の組換えバキュロウイルスによる感染は、大量のディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼタンパク質の産生を可能にする。さらに、バキュロウイルス系は、組換えディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの産生についての他の重要な利点がある。例えば、バキュロウイルスはヒトに感染せず、そしてそれゆえ、大量に安全に扱われ得る。バキュロウイルス系において、ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするDNAセグメントおよびベクターを包含するDNA構築物が調製される。ベクターは、バキュロウイルスの多核体遺伝子プロモーター領域、組換えの間の適切な交差に必要なバキュロウイルス隣接配列（この隣接配列は、プロモーター配列に隣接する約200〜300塩基対を含む）、および構築物が細菌において複製することを可能にする細菌の複製起点を含み得る。ベクターが構築され、その結果、(i) DNAセグメン

トが、多核体遺伝子プロモーターに隣接して（または、これに作動可能に連結して、またはこれの「下流」または「制御下に」）配置され、そして (ii) プロモーター/ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ、またはプロモーター/ディリジエンタンパク質の組合せの両側に、バキュロウイルスDNAの200〜300塩基対（隣接配列）が隣接する。

ディリジエンタンパク質DNA構築物、またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼDNA構築物を産生するために、全量ディリジエンタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNAクローンは、本明細書中に記載されるような方法を用いて得られる。DNA構築物は、宿

主細胞において、適切なバキュロウイルス（すなわち、構築物においてコードされるプロモーターと同じ種のバキュロウイルス）のバキュロウイルスDNAと、組換えが成立する条件下で接触される。得られる組換えバキュロウイルスは、完全なディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクタールをコードする。例えば、昆虫宿主細胞は、DNA構築物および機能的バキュロウイルスで、同時トランススフェクトされ得るかまたは別々にトランススフェクトされ得る。次いで、得られる組換えバキュロウイルスが単離され、そして細胞に感染させて、ディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの産生をもたらすために使用され得る。宿主昆虫細胞としては、例えば、Spodoptera frugiperda細胞が挙げられる。次いで、本発明の組換えバキュロウイルスに感染した昆虫宿主細胞は、バキュロウイルスにコードされるディリジェントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの発現を可能にする条件下で培養される。従って、産生される組換えタンパク質は、次いで、当該分野で公知の方法を用いて細胞から抽出される。

酵母のような他の真核微生物もまた、本発明を実施するために使用され得る。いくつかの他の株が利用可能であるが、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、一般的に使用される酵母である。プラスミドYRp7 (Strindcombら, Nature 282:39(1979); Kingsmanら, Gene 7:141(1979); Tschemperら, Gene 10:157(1980)) は、*Saccharomyces* における発現ベクターとして、一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファンにおいて増殖する能力を欠く酵母の変異体株（例え

ば、ATCC番号44,076およびPEP4-1 (Jones, Genetics 85:112(1977))) についての選択マーカーを提供するtrp1遺伝子を含む。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrp1損傷の存在は、トリプトファンの非存在下において増殖することにより形質転換を検出するための有効な環境を提供する。酵母宿主細胞は一般的に、Hinnen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929(1978)) に記載のように、ポリエチレングリコール法を用いて形質転換される。さらなる酵母形質転換プロトコルは、Gietzら, N.A.R. 20(17):1425(1992); Reevesら, FEMS 99:193-197(1992) に示される。

酵母ベクターにおける適切なプロモーター配列は、3-ホスホグリセレートキナーゼ (Hitzemanら, J. Biol. Chem. 255:2073(1980)) または他の解糖酵素 (Hessら, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149(1968); Hollandら, Biochemistry 17:4900(1978)) (例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ) についてのプロモーターを含む。適切な発現プラスミドの構築において、これらの遺伝子に関連する終結配列もまた、発現されることが所望される配列の3'側で発現ベクターに連結されて、mRNAのポリアダニル化および終結を提供する。増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、インシトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、および前述のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母適合性プロモーター、複製起点、および終結配列を含む任意のプラスミドベクターが適切である。

多細胞生物（例えば、植物）に由来する細胞培養物は、本発明を実施するための宿主として使用され得る。トランスジェニック植物は、例えば、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼおよび/またはディリジェントタンパク質をコードするプラスミド、ならびに選択マーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性をコードするkan遺伝子）を、Hoeckemaら, Nature 303:179-181(1983)に記載

されるように、ヘルパーTiプラスミドを含む *Agrobacterium tumefaciens* に移入し、そしてAnら, Plant Physiology 81:301-305(1986)に記載されるように、*Agrobacterium* 細胞を形質転換される植物の葉スライスとともに培養することによって得られ得る。培養した植物宿主細胞の形質転換は、通常、上記のように、*Agrobacterium tumefaciens* を介して達成される。哺乳動物宿主細胞および固い細胞膜バリアを有さない他の宿主細胞の培養は、通常、GrahamおよびVan der Eb (Virology 52:546(1978)) によって元々記載され、そしてSambrookら（前出）の第1

6.32~16.37節に記載されるように改変されたリン酸カルシウム法を用いて形質転換される。しかし、DNAを細胞に導入するための他の方法もまた使用され得る：例えば、ポリブレイン (KawaiおよびNishizawa, Mol. Cell. Biol. 4:1172(1984))、プロトプラスト融合 (Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163(1980))、エレクトロポレーション (Neumannら, BBIO J. 1:841(1982)、および核への直接マイクロインジェクション (Capechchi, Cell 22:479(1980))。さらに、動物形質転換ストラテジーは、Monastersky G.M.およびRobl, J.M., *Strategies in Transgenic Animal Science*, ASM Press, Washington, D.C. (1995)に概説される。形質転換植物カルスは、選択マーカーを介して、例えば、カナマイシンおよび適切な量の植物ホルモン (例えば、カルスおよびシュート誘導のためナフタレン酢酸およびベンジルアデニン) を含む培地で細胞を増殖させることによって選択される。次いで、植物細胞が再生され得、そして得られる植物は、当業者に周知の技術を用いて土壌に移される。

さらに、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ産生またはディリジエントタンパク質産生を調節する遺伝子は、誘導可能な必要プロモーターとともに植物に取り込まれ得る。本発明のこの実施態様の実施において、特定の外部または内部刺激のみに応答するプロモーターが、標的cDNAに融合される。従って、遺伝子は、特定の刺激に応答する以外には、転写されない。遺伝子が転写されない限りは、その遺伝子産物は産生されない。

本発明の実施において使用され得る応答性プロモーター系の例示的な例は、トウモロコシにおけるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 系である。GSTは、発生前除草剤としてしばしば使用される多数の疎水性電子化合物を解毒し

得る酵素のファミリーである (Weigandら, *Plant Molecular Biology* 7:235-243 (1986))。研究は、GSTが、この増強された除草剤耐性を生じることに関与することを示している。この作用は、主に、特定の1.1kb mRNA転写産物を通して媒介される。要約すれば、トウモロコシは、外部刺激に応答し得、そして遺伝子産物を産生するように誘導され得る、既に存在する天然に存在する静止遺伝子有する。この遺伝子は、以前に同定およびクローニングされている。従って、本

発明の1つの実施態様において、プロモーターは、GST応答遺伝子から取り出され、そして前もってその天然のプロモーターが除去されている、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ遺伝子、またはディリジエントタンパク質遺伝子に付着される。この操作された遺伝子は、外部化学刺激に応答するプロモーターと、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の首尾良い産生を担う遺伝子との組合せである。

上記の方法に加えて、クローン化DNAを広範な種々の植物種 (裸子植物、被子植物、単子葉植物、および双子葉植物を含む) に移入するためのいくつかの方法が、当該分野で公知である (例えば、GlickおよびThompson編, *Methods in Plant Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1993)を参照のこと)。例示的な例としては、プロトプラストによるエレクトロポレーション促進性DNA取り込み (Rhodesら, *Science* 240(4849):204-207(1988))：プロトプラストのポリエチレングリコールでの処理 (Lyznickら, *Plant Molecular Biology* 13:151-161(1989))：および細胞のDNA荷重 (laden) 微粒子銃 (Kleinら, *Plant Physiology* 91:440-444(1989)およびBoyntonら, *Science* 240(4858):1534-1538(1988))

の照射が挙げられる。多数の方法が、例えば、禾穀類の形質転換について現在存在する (例えば、McKinnon, G.E.およびHenry, R.J., *J. Cereal Science*, 22(3):203-210(1995)；Mendel, R.R.およびTeeri, T.H., *Plant and Microbial Biotechnology Research Series*, 3:81-98, Cambridge University Press (1995)；McElroy, Y.D.およびBrettell, R.I.S., *Trends in Biotechnology*, 12(2):62-68(1994)；Christouら, *Trends in Biotechnology*, 10(7):239-246(1992)；Christou, P.およびFord, T.L., *Annals of Botany*, 75(5):449-454(1995)；Parkら, *Plant Molecular Biology*, 32(6):1135-1148(1996)；Altpeiterら, *Plant Cell Reports*, 1

6:12-17(1996)を参照のこと)。さらに、植物形質転換ストラテジーおよび技術は、Birch, R.G., *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48:297(1997)；Foresterら, *Exp. Agric.*, 33:15-33(1997)に概説される。わずかな改変により、これらの技術が広範な植物種に適用可能である。

これらの技術の各々は、利点と欠点を有する。各々の技術において、プラスミ

ドからのDNAは、目的の遺伝子のみでなく、選択可能マーカー遺伝子およびスクリーニング可能マーカー遺伝子をも含むように遺伝子操作される。選択可能マーカー遺伝子は、プラスミドのコピーを取り込んでいるこれらの細胞のみを選択するのに使用される（目的の遺伝子および選択可能遺伝子およびスクリーニング可能遺伝子が、一単位として移入されるように構築される）。スクリーニング可能な遺伝子は、目的の遺伝子を有するこれらの細胞のみの首尾良い培養のための別の遺伝子を提供する。一般的に使用される選択可能マーカー遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII (NPT II) である。この遺伝子は、カナマイシン（細胞が増殖する増殖培地に、直接添加され得る化合物）に対する耐性を伝達する。植物細胞は、通常、カナマイシンに感受性であり、そして結果として死亡する。NPT II遺伝子の存在は、カナマイシンの影響を克服し、そしてこの遺伝子を有する各々の細胞は、生存したままである。本発明の実施において使用される、別の選択可能マーカー遺伝子は、除草剤グルフォシネート (glufosinate) (Basta) への耐性を付与する遺伝子である。一般的に使用されるスクリーニング可能な遺伝子は、 β グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) である。この遺伝子の存在は、組織化学反応（推定的に形質転換される細胞のサンプリングが、GUSアッセイ溶液で処理される）を用いて特徴づけられる。適切なインキュベーションの後、GUS遺伝子を含む細胞は青色に変わる。好ましくは、プラスミドは、選択可能マーカー遺伝子およびスクリーニング可能マーカー遺伝子の両方を含む。

これらの遺伝子の1つ以上を含むプラスミドは、植物プロトプラストまたはカルス細胞のいずれかに、以前に言及した技術のいずれかによって導入される。マーカー遺伝子が選択可能な遺伝子である場合、DNAパッケージを取り込んでいるこれらの細胞のみが、適切な植物毒素試験での選択下で生存可能である。一旦、適切な細胞が同定されそして繁殖されると、植物は再生される。形質転換植物がらの子孫は、DNAパッケージが植物ゲノムに首尾良く取り込まれていることを保証するために、試験されなければならない。

哺乳動物宿主細胞もまた、本発明の実施において使用され得る。適切な哺乳動物細胞株の例としては、以下が挙げられる：SV40によって形質転換されたサル腎

臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胎児性腎臓株293S (Grahamら, J. Gen. Virol. 36:59(1977))；ペペーハムスター腎臓細胞 (8HK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 (UrlabおよびChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))；マウス sertoli 細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243(1980))；サル腎臓細胞 (CVL-76, ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸ガン細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；コーニング腎臓細胞 (MOC、ATCC CCL 34)；バックフローラット肝臓細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (WL38, ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2, HB806 5)；マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060362, ATCC CCL 51)；ラット肝臓ガン細胞 (HTC, MT-54, Baumanら, J. Cell Biol. 85:1(1980))；ならびにTRI細胞 (Matherら, Amal's N.Y. Acad. Sci. 383:44(1982))。これらの細胞についての発現ベクターは、本来（必要であれば）、複製起点、発現される遺伝子の前に位置するプロモーター、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終結部位のDNA配列を含む。

哺乳動物発現ベクターに使用されるプロモーターは、しばしば、ウイルス起源である。これらのウイルスプロモーターは、一般的には、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、および最も頻繁には、サルウイルス40 (SV40) に由来する。SV40ウイルスは、初期および後期プロモーターと称される2つのプロモーターを含む。これらのプロモーターは特に有用である。なぜなら、それらは阿方、ウイルス複製起点も含む1つのDNAフラグメントとして、ウイルスから容易に得られるからである (Fiersら, Nature 273:113(1978))。より小さなまたはより大きなSV40 DNAフラグメントもまた使用され得る。ただし、これらのフラグメントは、ウイルス複製起点に位置するBglII部位に向かうHindIII部位から伸張される約250bp配列を含む。

あるいは、外来遺伝子と天然に会合するプロモーター（同種プロモーター）が使用され得る。ただし、これらのフラグメントは、形質転換のために選択される宿主細胞株と適合可能である。

複製起点は、外因性供給源（例えば、SV40または他のウイルス（例えば、ポリ

オーマ、アデノ、VSV、BPV) から得られ得、そしてクロロニンゲクベクターに挿入され得る。あるいは、複製起点は、宿主細胞染色体複製機構によって提供される。外来遺伝子を含むベクターが、宿主細胞染色体に取り込まれる場合、後者はしばしば重要である。

二次DNAコード配列の使用は、形質転換細胞株におけるビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の産生レベルを増強し得る。二次コード配列は、代表的には、酢酸ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を含む。DHFRの野生型形態は、通常、化学メトトレキセート (MTX) によって阻害される。細胞におけるDHFR発現のレベルは、培養宿主細胞に添加されるMTXの量に依存して変化する。二次配列として特に有用にするDHFRのさらなる特徴は、形質転換細胞を同定するための選択マーカーとして使用され得ることである。DHFRの2つの形態は、二次配列、野生型DHFR、およびMTX耐性DHFRとしての使用に利用可能である。特定の宿主細胞に使用されるDHFRの型は、宿主細胞がDHFR欠損であるかどうかにかかわらず (その結果、内因的に非常に低いレベルのDHFRを産生するか、または全く機能的DHFRを産生しないかのいずれかである)。UrtaubおよびCrasin (前出) によって記載されるCHO細胞株のようなDHFR欠損細胞株、野生型DHFRコード配列で形質転換される。形質転換後、これらのDHFR欠損細胞株は、機能的DHFRを発現し、そして栄養性ヒポキサンチン、グリシン、およびチミンを欠如する培養培地において増殖し得る。非形質転換細胞は、この培地において生存しない。

DHFRのMTX耐性形態は、MTX感受性である正常な量の機能的DHFRを内因的に産生するこれらの宿主細胞において形質転換宿主細胞についての選択手段として使用され得る。CHO-K1細胞株 (ATCC番号D61) は、これらの特徴を所有し、従って、この目的のための有用な細胞株である。MTXの細胞培養培地への添加は、MTX耐性DHFRをコードするDNAで形質転換したこれらの細胞のみを、増殖することを可能にする。非形質転換細胞は、この培地において生存し得ない。

原核生物もまた、本発明の最初のクロロニンゲク工程のための宿主細胞として使用され得る。それらは、大量のDNAの迅速な産生のため、部位特異的変異誘発の

ために使用される一本鎖DNAテンプレートの産生のため、同時に多くの変異体をスクリーニングするため、および生成した変異体のDNA配列決定のために特に有用である。適切な原核生物宿主細胞としては、E.coli K12株294 (ATCC番号31,446)、E.coli株W3110 (ATCC番号27,325)、E.coli XL776 (ATCC番号31,537)、およびE.coli18が挙げられる；しかし、E.coliの多くの他の株 (例えば、HB101、JM101、NM522、NM538、NM539)、ならびに桿菌 (例えば、Bacillus subtilis) 他の腸内細菌科 (例えば、Salmonella typhimuriumまたはSerratia marcescens)、および種々のPseudomonas種を含む原核生物の多くの他の種および属は全て、宿主として使用され得る。原核生物宿主細胞または強固な細胞壁を有する他の宿主細胞は、好ましくは、Sambrookら (前出) のセクション1.82に記載されるような塩化カルシウム法を用いて形質転換のために使用され得る。原核生物形質転換技術は、Dover, W.J., in Genetic Engineering, Principles and Methods, 12:275-296, Plenum Publishing Corp. (1990); Hanahanら, Meth. Enzymol., 204:63 (1991) に示される。

代表的な例として、ディリジエントタンパク質またはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼをコードするcDNA配列は、異宿主主としてのE.coliにおける過剰発現のために、市販の (Novagenから) (His)₆ Tag pETベクターに移入され得る。このpET発現プラスミドは、高レベルの異種発現系におけるいくつかの利点を有する。所望のcDNAインサートは、インフレーションで、6ヒスチジンをコードするプラスミドベクター配列に連結され、続いて標的タンパク質のアミノ末端コドンに結合される高度に特異的なプロテアーゼ認識部位 (トロンピン) に連結される。発現される融合タンパク質のヒスチジン「ブロック」は、固定化金属イオンへの非常に強固な結合を促進し、そして固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィーによる組換えタンパク質の迅速な精製を可能にする。次いで、ヒスチジンリーダー配列は、特異的なタンパク質分解部位で、精製タンパク質のトロンピンでの処理によって切断され、そしてディリジエントタンパク質または

ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼが溶出される。この過剰発現-

複製系は、高能力で優れた分解能を有し、迅速であり、そして（トロンピンタンパク質分解の前および後に）同様の結合挙動を示すE.coliタンパク質が複雑する機会を極めて小さくする。

当業者に明らかなように、宿主細胞に適合する種に由来するレプリコンおよび制御配列を含む任意のプラスミドベクターもまた、本発明の実施において使用され得る。ベクターは通常、複製部位、形質転換細胞における表現型選択を提供するマーカー遺伝子、1つ以上のプロモーター、および外来DNAの挿入のためのいくつかの認識部位を含むポリリンカー領域を有する。E.coliの形質転換のために代表的に使用されるプラスミドとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、およびBluescript ML3が挙げられ、これらは全て、Sambrookら（前出）の第1.12～1.20章に記載される。しかし、多くの他の適切なベクターも同様に利用可能である。これらのベクターは、アンピシリンおよび/またはテトラサイクリン耐性をコードする遺伝子を含み、これは、これらのベクターで形質転換した細胞が、これらの抗生物質の存在下で増殖することを可能にする。

原核生物ベクターに最も一般的に使用されるプロモーターは、 β ラクタマーゼ（ベニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Changら、Nature 375:615 (1978)；Itakuraら、Science 198:1056(1977)；Godde1ら、Nature 281:544(1979)）ならびにトリプトファン（trp）プロモーター系（Goedde1ら、Nuc1.Acids.Res. 8:4057(1980)；EPO Appl.Publ.No.36,776）、ならびにアルカリホスファターゼ系を含む。これらは最も一般的に使用されるが、他の微生物プロモーターが利用されており、そしてそれらのヌクレオチド配列を確認する詳細は刊行されており、当業者が、プラスミドベクターにそれらを機能的に連結することを可能にする（Siebenlistら、Cell 20:289(1980)を参照のこと）。

細胞から通常分泌される多くの真核生物タンパク質は、アミノ酸配列の一部として、内因性分泌シグナル配列を含む。従って、細胞質に通常見いだされるタンパク質は、シグナル配列をタンパク質に連結することによって分泌のために標的化され得る。これは、シグナル配列をコードするDNAを、タンパク質をコードするDNAの5'末端に連結し、次いでこの融合タンパク質を適切な宿主細胞において

発現することによって容易に達成される。シグナル配列をコードするDNAは、シグナル配列を有するタンパク質をコードする任意の遺伝子からの制限フラグメントとして得られ得る。従って、原核生物、酵母、および真核生物シグナル配列は、本発明を実施するのに利用される宿主細胞の型に依存して、本明細書中使用され得る。いくつかの真核生物遺伝子のシグナル配列部分（例えば、ヒト成長ホルモン、プロインシュリン、およびプロアルブミンを含む）をコードするDNAおよびアミノ酸配列は公知であり（Stryer, Biochemistry W.H.Freeman and Company, New York, NY, 769頁(1988)を参照のこと）、そして適切な真核生物宿主細胞におけるシグナル配列として使用され得る。例えば、酸ホスファターゼ（Arimaら、Nucleic Acids Res. 11:1657(1983)）、 α 因子、アルカリホスファターゼ、およびインペルターゼのような酵母シグナル配列は、酵母宿主細胞からの分泌を指向するために使用され得る。例えば、Lam8もしくはOmpF（Wongら、Gene 68:193(1988)）、NalE、PhoA、または β ラクタマーゼをコードする遺伝子ならびに他の遺伝子からの原核生物シグナル配列は、原核生物細胞からのタンパク質を培養培地に標的するために使用され得る。

植物、動物、および微生物からの輸送配列は、本発明の実施において、遺伝子産物を、細胞質、小胞体、ミトコンドリア、もしくは他の細胞成分に指向するため、または培地への搬出のためにタンパク質を標的するために使用され得る。これらの考察は、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼまたはディリジエントタンパク質の過剰発現、および任意の所望の位置における遺伝子産物の機能を実行するための細胞またはインタクトな生物内での発現の指向に適用される。

目的の複製配列、調節配列、表現型選択遺伝子をコードするDNA、およびディリジエントタンパク質DNAまたはビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼDNAを含む適切なベクターの構築物は、標準的な組換えDNA手順を用いて調製される。単離されたプラスミドおよびDNAフラグメントは、当分野で周知のように（例えば、Sambrookら（前出）を参照のこと）、切断され、仕立てられ、そして所望のベクターを作製するために特定の順序で一緒に連結される。

上記で議論したように、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ改変

体またはディリジエントタンパク質改変体は、好ましくは、部位特異的変異誘発の方法を用いて作製される変異（単数または複数）によって産生される。この方法は、オリゴヌクレオチドがDNAテンプレートに安定にハイブリダイズすること、を可能にするために、所望の変異の配列および十分な数の隣接ヌクレオチドの両方をコードする特定のオリゴヌクレオチドの合成および使用が必要である。

ディリジエントタンパク質遺伝子および/またはビノレシノール/ラリシレン/ノールレダクタールゼ遺伝子、あるいはディリジエントタンパク質遺伝子またはビノレシノール/ラリシレン/ノールレダクタールゼ遺伝子の全てまたは一部に相補的なアンチセンス核酸フラグメントは、適切な場合には、種々の目的のための任意の植物種に導入され得、この目的には以下が含まれるがこれらに限定されない：木組織（特に心材組織）の色、手触り、耐久性、および害虫耐性を改変または改善すること；トウモロコシ（これは、動物飼料として有用である）のような植物種におけるリグナンおよび/またはリグニンの形成を低減し、それにより植物材料を採取する動物の消化系への植物材料のセルロース画分の利用可能性を増強すること；バルブおよび紙産生において利用される食物種のリグナン/リグニン含有量を低減し、それにより、より容易および安価にバルブおよび紙を産生すること；捕食動物および病原体に対する植物の防御能力を、防御的リグナンまたはリグニンの産生を増強することによって改善すること；リグナンまたはリグニンによって媒介される他の生態学的相互作用の改変；医薬または植物添加剤として、上昇したレベルの光学的に純粋なリグナン鏡像異性体を産生すること；ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレン/ノールレダクタールゼの産生、あるいはビノレシノールまたはラリシレン/ノールおよびそれらの誘導体の産生を誘導するか、増強するか、または阻害すること。ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレン/ノールレダクタールゼ遺伝子は、種々の目的のために任意の生物に導入され得、この目的は以下を含むがこれらに限定されない：ディリジエントタンパク質および/またはビノレシノール/ラリシレン/ノールレダクタールゼの産生、あるいはビノレシノールまたはラリシレン/ノールおよびそれらの誘導体の産生を誘導するか、増強するか、または阻害すること。

前述は、以下の例示的な実施例と組み合わせにより完全に理解され得、ここで「プラスミド」は、英小文字p、続く英数字によって示される。本発明において使用される開始プラスミドは、市販されるか、無制限の基準に基づいて公に入手可能であるか、または公開された手順を用いてこのような入手可能なプラスミドから構築され得る。さらに、他の等価なプラスミドは当該分野で公知であり、そして当業者には明らかである。

DNAの「消化」、「切断」、または「切断」は、DNAにおける特定の位置でのみ作用する酵素で、DNAの触媒切断をいう。これらの酵素は、制限エンドヌクレアーゼと称され、そして各酵素が切断するDNA配列に沿った部位は、制限部位と称される。本発明において使用される制限酵素は市販され、そして製造業者によって提供される説明書に従って使用される。（Sambrookら（前述）の第1.60-1.61章および第3.38-3.39章もまた参照のこと）

制限消化物からのDNAの所定のフラグメントの「回収」または「単離」は、ポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上での得られたDNAフラグメントの電気泳動による分離、その移動度対公知の分子量のマーカーDNAフラグメントの比較による目的のフラグメントの同定、所望のフラグメントを含むゲル区画の除去、およびゲルのDNAからの分離を意味する。この手順は一般的に公知である。例えば、Lawlis (Nucleic Acids Res. 9:6103-6114(1982))、およびGoeddelら(Nucleic Acids Res., (前出))を参照のこと。

以下の実施例は、本発明を実施するために現在意図される最良の態様を単に例示するに過ぎないが、本発明を制限すると解釈されるべきではない。本明細書中に引用される全ての文献は、参考として明白に援用される。

実施例1

ディリジエントタンパク質のForsythia intermediaからの精製

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Baffley's Nursery (var. Lynwood Gold, St. Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持するか、または地域団体からの贈られたもののいずれかであった。

最初の抽出および硫酸アンモニウム沈殿。結合タンパク質の可溶性を、4℃で

行った。冷凍Forsythia intermedia茎(2kg)を、液体窒素の存在下で、warrior 9 Blendor (Model CB6)において微粉砕した。得られる粉末を、5mMジチオスレイトールを含む0.1M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液(pH7.0、4リットル)で均一化し、そして4層のチューブクロスを通して濾過した。不溶性残留物を、250rpmの連続撹拌で、以下のように連続して抽出した：冷却(-20℃)再蒸留アセトン(4リットル、3×30分)；0.1%βメルカプトエタノールを含む0.1M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液(pH6.5)(溶液A、8リットル、30分)；1%Triton X100を含む溶液A(8リットル、4時間)および最終的に溶液A(8リットル、16時間)。各抽出の間、残留物を、1層のMiracloth (Calbiochem)を通して濾過した。(+)βノレシノール形成系の可溶化を、1M NaClを含有する溶液Aにおいて残留物を機械的に撹拌することによって達成した。ホモジネートをデカントし、そして得られる溶液を、Miracloth (Calbiochem)およびガラス繊維(C6, Fisher Sci.)を通して連続して濾過した。濾過物を、Amiconセル(Model 2000, YMC)において、最終用量約800mlまで濃縮し、そして $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画に供した。40~80%飽和のタンパク質沈殿を、遠心分離(15,000g、30分)によって回収し、そして $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ベレットを、必要とされるまで-20℃にて保存した。

Mono Sカラムクロマトグラフィー。78kDディリジェントタンパク質の精製およびオキシダーゼの部分精製。硫酸ベレット(2kg)のF intermedia茎から得た)を、6M NaOHでpH5.0に調整した40mM MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)緩衝液(溶液B、30ml)で再構築し、スラリーを遠心分離し(3,600g、5分)、そして上清を溶液B(4リットル)で一晩透析した。透析抽出物を濾過し(0.22μm)、そしてサンブル(35~40mgタンパク質)を、4℃にて溶液Bで平衡化したMono S HR5/5 (50mm×5mm)カラムにアブライした。溶液B(13ml)で溶出(流速5ml min⁻¹cm⁻²)した後、タンパク質を、溶液B中の以下の Na_2SO_4 で脱着した：8mlでの0~100mMの直線勾配を用い、そしてこの濃度で32ml維持し、次いで133mMを50ml、166mMを50ml、200mMを40ml、233mMを40ml、そして最終的に333mM Na_2SO_4 を40mlでの一連のステップ勾配を実行する。E-コニフェリルアルコールから(+)βノレシノールを形成し得る画分を、333mM Na_2SO_4 で溶出し、合わせて、必要とまで保存した(-80℃)。

POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー(第1カラム)。Mono S HR5/5カラム(33mM Na_2SO_4)からの15の個々の溶出物からの画分を合わせ(18.5m 9タンパク質、180ml)、そして溶液Cに対して一晩透析した。透析した酵素溶液(190ml)を濾過し(0.22μm)、そしてアニコート(47ml)を、POROS SP-Mカラムにアブライした。予め25mM MES-HEPES-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0、溶液C)で平衡化したPOROS SP-Mマトリックス(100mm×4.6mm)での全ての分離を、60ml min⁻¹cm⁻²の流速および室温にて行った。溶液C(12ml)での溶出後、タンパク質を溶液Cにおける直線 Na_2SO_4 勾配(66.5ml中0から0.7M)で脱着し、ここで確立した濃度を、さらなる16.6mlについて保持した。これらの条件下で、別々の4つの画分(I、II、III、およびIV)を、それぞれ、約40、47、55、および61mSで達成した。この精製工程を、残留透析酵素抽出物で3回繰り返し、そして各実験からの画分I、II、III、およびIVを別々に合わせた。プロテアーゼインヒビター(すなわち、フェニルメタンスルホンフルオリド(0.1mmol ml⁻¹)、EDTA(0.5mmol ml⁻¹)、ペプスタチンA(1μg ml⁻¹)、およびアンチペイン(1μg ml⁻¹))を、可溶化および全ての続く精製段階の間に添加した場合、画分I、II、III、およびIVの溶出プロファイルにおいて相違は観察されなかった。

POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー(第2カラム)。第1POROS SP-Mマトリックスカラムクロマトグラフィー工程からの画分I(2.62mgタンパク質、40ml、約24.6mS)を、濾過した冷蒸留水において、約8mSの伝導率を達成するまで希釈した(最終容量=150ml)。次いで、希釈したタンパク質溶液を、POROS SP-Mカラム(100mm×4.6mm)にアブライした。溶液C(12ml)での溶出後、画分Iを、20ml中0~0.25Mの直線 Na_2SO_4 勾配で脱着し、ここで確立した濃度を、さらに25mlについて保持した。これに続いて、26ml中0.25~0.7Mの直線 Na_2SO_4 勾配で行い、次いでさらなる16.6mlについて0.7Mで維持した。約30mSで溶出した画分(溶出物のイオン強度を、貫流検出器で測定した)を合わせ(15ml、1.3mg)、水で希釈し、そして再クロマトグラフした。得られるタンパク質(上記の勾配で約30mSで溶出した)を、必要とまで保存した(-80℃)。

ゲル濾過。画分Iからのアニコート(595.5μgタンパク質、3ml、約30mSで溶出)を、0.6mlまで濃縮し(Centricon 10, Amicon)、そして4℃にて50mM Na_2SO_4

を含む0.1M MES-HEPES-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で平衡化したS200 (73.2cm×1.6cm, Pharmacia-LKB) ゲルクロマトグラフィーカラムにロードした。見かけ上均一な78kDディジェントタンパク質 (242 μ g) を、133mlの単一の成分として溶出した (流速0.25ml min⁻¹ cm⁻¹) (V₀=105ml)。分子量を、それらの溶出プロファイルの以下の標準タンパク質との比較によって見積もった: β アミラーゼ (200,000)、アルコールデヒドロゲナーゼ (150,000)、ウシ血清アルブミン (66,000)、オボアルブミン (45,000)、炭酸脱水素酵素 (29,000)、およびシクロクロムC (12,400)。

英用例2

精製ディジェントタンパク質の特徴付け

分子量および等電点決定。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を、Laemmliの緩衝液系において、勾配 (4~15%アクリルアミド, Bio-Rad) ゲルで、彼らおよび還元条件下で行った。タンパク質を、銀染色によって可視化した。画分Iのゲル透過 (S200) クロマトグラフィーは、天然の分子量約78kDのタンパク質を与え、一方SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、約27kDの一本のバンドを示し、これは、天然のタンパク質が三量体として存在することを示唆する。ポリアクリルアミドゲルにおける天然のタンパク質の等電点電気泳動 (pH3~10勾配) は、6つのバンドの存在を明らかにした。等電点電気泳動後、これらのバンドの各々を、ポリビニルデンフルオリド (PVDF) 膜に電気プロットし、そしてアミノ末端配列決定に供した。これは、全てが一連のアイソフォームを示す類似の配列を有したことを確認した。タンパク質の紫外光-可視光スペクトルは、約330nmでのわずかに認識できるシヨルターとともに、280nmでの特徴的なタンパク質吸収のみを有した。誘導結合型プラズマ (ICP) 分析は、タンパク質に存在する金属を全く示さなかった。従って、78kDディジェントタンパク質は、任意の抽出可能な触媒活性酸化中心を欠如する。

E-コニフェリルアルコールから(+)-ピノレシノールを形成する精製ディジェントタンパク質の能力のアッセイ。第1 POROS SP-Mカラムクロマトグラフィー工程 (英用例1) からの4つの画分 (I~IV) を、別々に再クロマトグラフィーし

各画分を、続いて、基質としてのE-[9-³H]コニフェリルアルコールとの(+)-ピノレシノール形成活性について1時間アッセイした。画分I (ディジェントタンパク質を含む) は、非常にわずかな(+)-ピノレシノール形成活性 (POROS SP-Mカラムにロードした全活性の<5%) を有し、一方、画分IIは、非特異的酸化カプリングを触媒して(±)-デヒドロコニフェリルアルコール、(±)-ピノレシノール、および(±)-エリスロ/スレオオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエーテルを生じた。従って、画分IIIは、内因性植物酵素添加タンパク質を含むようである。

精製オキシダーゼ調製物 (画分II) を、電気泳動的に均質まで精製していいが、このタンパク質調製物の電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルは、代表的な植物ラッカーゼ (すなわち、天然に存在する植物オキシダーゼタンパク質のクラス) のスペクトルと類似した。次いで、本発明者らは、オキシダーゼ (画分II)、78kDのディジェント (dirigent) タンパク質 (画分I) のそれぞれ、および画分IIIと78kDタンパク質の両方の存在下で、E-[9-³H]コニフェリルアルコール (2 μ mol ml⁻¹, 14.7kBq) の最終結果を研究した。画分II調製物単独では、非特異的二分子ラジカルカップリングのみが生じて、(±)-デヒドロコニフェリルアルコール、(±)-ピノレシノール、および(±)-エリスロ/スレオオグアヤシルグリセロール8-O-4'-コニフェリルアルコールエーテルを生じた。しかし、78kDタンパク質自身では、少量の(+)-ピノレシノール形成 (10時間にわたって<5%) が観察され、これは、調製物における酸化能力の残留追跡から生じると推定された。画分IIIと78kDタンパク質の両方を合わせた場合、産物中の完全な触媒活性ならびに位置特異性および立体特異性が回復され、それにより本質的に(+)-ピノレシノールのみが形成される。さらに、画分III単独で、そして画分IIIを78kDタンパク質と合わせた場合、基質消費 (depletion) および二量体産物形成の速度は、ほぼ同一であった。さらに、オキシダーゼの存在下のいずれの場合においても、試験した時間 (8時間) を通じて、二量体リグナン産物は本質的に代謝的代謝回転しなかった；続く二量体酸化は、E-コニフェリルアルコール (好ましい

基質)がアッセイ混合物に存在したままの場合、生じない。それゆえ、78kDタンパク質は、二分子フェノキシナジカルカップリング反応の特異性を決定する

ようである。

ゲル透過研究もまた、任意の検出可能なタンパク質-タンパク質相互作用が、立体選択性について説明し得るかどうかを確認するために、ディリジェントと画分IIIタンパク質の混合物で行った。しかし、複合体形成を指示する証拠(すなわち、より高分子のサイズ体)は、観察されなかった。

実施例3

78kDディリジェントタンパク質の

植物ラッカーゼ触媒性モノグラブリングにおける効果

E-コニフェリルアルコールカップリングアッセイ。E-[9-³H]コニフェリルアルコール ($4 \mu\text{mol ml}^{-1}$, 29.3kBq) を、120kDラッカーゼ (Forsythia intermedia 葉組織から以前に精製した) とともに、24時間にわたって、ディリジェントタンパク質の存在および非存在下で、以下のようにインキュベートした。各アッセイは、全容量 $250 \mu\text{l}$ の緩衝液 (0.1M MES-HEPES-酢酸ナトリウム, pH5.0) 中、E-[9-³H]コニフェリルアルコール ($4 \mu\text{mol ml}^{-1}$, 29.3kBq, 7.3Mq mole liter⁻¹) ; または画分IIIとともに $2 \mu\text{mol ml}^{-1}$, 14.7kBq)、78kDディリジェントタンパク質、オキシダーゼまたは酸化剤、あるいは両方 (最終濃度: 770cpm ml⁻¹ ディリジェントタンパク質; 10.7pmolタンパク質 ml⁻¹ Forsythia ラッカーゼ; 12 μg タンパク質 ml⁻¹ 画分III; $0.5 \mu\text{mol ml}^{-1}$ FAD; $0.5 \mu\text{mol ml}^{-1}$ FAD; 1 および 10 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ 過酸化二硫酸アンモニウム)。酵素反応を、E-[9-³H]コニフェリルアルコールの添加によって開始した。コントロールを、緩衝液のみの存在下で行った。

30℃にて振盪しながら1時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射化学キャリアとして、(±)-デノレシノール (7.5 μg)、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコール (3.5 μg)、および(±)-エリスロ/スレオグアアシルグリセロール-8-O-4'-コニフェリルアルコールエステル (7.5 μg)、ならびに内部標準としてフェララ酸 (15.0 μg) を含む酢酸エチル (EtOAc, 500 μl) で抽出し

た。遠心分離 (13,800g, 5分) 後、EtOAc可溶性成分を取り出し、そして抽出手順を、EtOAc (500 μl) で反復した。各アッセイからのEtOAc可溶性成分を合わせ、溶液を真空下で吸引して乾燥し、そのアリコート (50 μl) とともにメタノール-

水溶液 (1:1, 100 μl) に再溶解し、逆相カラムクロマトグラフィー (Waters, Nova-Pak C₁₈, 150mm×3.8mm) に供した。溶出条件は以下: アセトニトリル/H₂O 中3%酢酸 (5:95) で0~5分、次いで10:90の比の直線勾配で5分と20分との間、ついで20:80で20分と45分との間で、および最後に50:50で45~60分で、流速 8.8ml min⁻¹ cm⁻² であった。

E-コニフェリルアルコール、(±)-エリスロ/スレオグアアシルグリセロール-8-O-4'-コニフェリルアルコール、(±)-デヒドロジコニフェリルアルコール、および(±)-デノレシノール、に対応する画分を、別々に回収し、アリコートを液体シンチレーションカウンティングのために除去し、そして残りを凍結乾燥した。デノレシノール含有画分を、メタノール (100 μl) に再溶解し、そして移動相としてヘキサノンとエタノール (1:1) の溶液を有するキラルカラムクロマトグラフィー (Daicel, Chiralcel OD, 50mm×4.6mm) に供し (流速 3 ml min⁻¹ cm⁻²)、一方、デヒドロジコニフェリルアルコール画分を、Chiralcel OF (250mm×4.6mm) カラムクロマトグラフィーに供して、移動相としてヘキサノンとイソプロパノール (9:1) の溶液で溶出 (流速 2.4 ml min⁻¹ cm⁻²) し、溶出物の放射活性を、フロースルー検出器 (Radiomatic, Model A120) で測定した。

E-コニフェリルアルコールカップリングアッセイの結果。ラッカーゼ単独でのインキュベーションは、優勢な(±)-デヒドロジコニフェリルを有する、ラセミ二量体産物のみを生じた。しかし、ディリジェントタンパク質の存在下で、ラッカーゼのみが存在する場合に観察される非特異性とは異なり、このプロセスは、今や、(+)-デノレシノールを産生する一次立体選択性であった。両方のE-コニフェリルアルコール (基質) 減損の速度および二量体リグナンの形成は、ディリジェントタンパク質を伴っても伴わなくても類似であった。実質的な差異は、E-コニフェリルアルコール減損後に観察されるリグナン産物の続く代謝回転にみられ

た。ラッカーゼ単独では代謝回転を生じないが、両方のタンパク質が存在した場合は、産物の消失は顕著であった。差異を理解する目的で、ディリジエントタンパク質の重量濃度と一致したレベルのウシ血清アルブミン (BSA) およびオポアルブミンを、ラッカーゼ含有溶液に別々に添加するアッセイを行った。この方法において、産物代謝回転の差異は、高度なタンパク質濃度でのラッカーゼ活性の安定化に単純に起因することが確認されたが、興味深いことに、ディリジエントタンパク質、BSA、およびオポアルブミンは、いくらか異なる程度の保護を有した。この知見は、真菌ラッカーゼ (*Trametes versicolor* 由来) を植物ラッカーゼのかわりに使用した場合に、非常に匹敵した。酸化力 (すなわち、ラッカーゼ濃度) が5倍低い場合、(+)-ビノレシノールのみを観察した。従って、完全な立体選択性は、酸化力が、ディリジエントタンパク質が飽和する点を超えない場合に保存される。

立体選択的E-コニフェリルアルコールカップリング。アッセイをまた、E-[9- H_2 , OC_2H_5]コニフェリルアルコールおよびディリジエントタンパク質で、ラッカーゼの存在下で以下のように行った。E-[9- H_2 , OC_2H_5]コニフェリルアルコール ($2 \mu\text{mol ml}^{-1}$) を、全容量 $250 \mu\text{L}$ 中、ディリジエントタンパク質 (770pmol ml^{-1})、精製植物ラッカーゼ (4.1pmol ml^{-1})、および緩衝液 (0.1M MES-HEPES-pH5.0) の存在下でインキュベートした。1時間のインキュベーションの後、反応混合物をEtOAcで、しかし、内部標準および放射性化学キャリアの添加は省いて抽出した。逆相カラムクロマトグラフィーの後、酵素的に形成したビノレシノールを回収し、蒸気乾燥し、メタノール ($100 \mu\text{L}$) 中に再溶解し、そしてキラルカラムクロマトグラフィー (Daicel, Chiralcel OD, $50 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$) に供して、280nmで検出し、そしてEIモードにおいて質量分析フラグメント化によって分析した (Waters, Integrity System)。得られた(+)-ビノレシノール (>99% 鏡像異性体過剰) の液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 分析は、荷電比 (m/z) 368 に対する質量を有する分子イオンを生じ、従って、 $100\% H$ 原子の存在を確立すること、ならびにE-[9- H_2 , OC_2H_5]コニフェリルアルコールの立体選択的カップリングに触媒されるラッカーゼおよびディリジエントタンパク

質とともに証明された。

他の補助 (auxiliary) 1電子酸化剤もまた、ディリジエントタンパク質との立体選択的カップリングを容易にし得る。過酸化二硫酸アンモニウムは、等方性分化を容易に行い (A. Usaitis, R. Makusuka, Polymer 35:4896(1994))、そしてアクリルアミドポリマー化における1電子酸化剤として日常的に使用される。過酸化二硫酸アンモニウムを、最初に、E-[9- 3H]コニフェリルアルコール ($4 \mu\text{mol}$

1 ml^{-1} , 29.3kBq) とともに、6時間、上記のE-コニフェリルアルコールカップリングアッセイ手順を用いてインキュベートした。非特異的二分子ラジカルカップリングが観察され、優性な(±)-アピドロジコニフェリルアルコール、および他のラセミリグナンを得た (表1)。しかし、ディリジエントタンパク質を添加した場合、カップリングの立体選択性は劇的に変化して、両濃度の酸化剤で、少量のラセミリグナンとともに第一の(+)-ビノレシノールを生じた。これは、無機酸化剤 (例えば、過酸化二硫酸アンモニウム) が、たとえ画分IIIオキシダーゼまたはラッカーゼと同様にモノリグノールに対して選択的に酸化性でなくとも、ディリジエントタンパク質の存在下で(+)-ビノレシノール合成を促進し得ることを確認した。

(6)	(59)				(60)			
	非特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)	特異的 (nmol ml ⁻¹)
200 ± 4	250 ± 55	860 ± 30	1030 ± 25	61 ± 20	200 ± 4	250 ± 55	860 ± 30	1030 ± 25
10 ± 1	6 ± 0	90 ± 4	30 ± 1	5 ± 1	10 ± 1	6 ± 0	90 ± 4	30 ± 1
35 ± 2	13 ± 1	250 ± 10	90 ± 3	8 ± 1	35 ± 2	13 ± 1	250 ± 10	90 ± 3
16 ± 0	0	135 ± 4	0	0	16 ± 0	0	135 ± 4	0
0	130 ± 10	0	450 ± 10	55 ± 1	0	130 ± 10	0	450 ± 10
61 ± 3	149 ± 11	475 ± 17	570 ± 14	68 ± 3	61 ± 3	149 ± 11	475 ± 17	570 ± 14

表 1
酸化二酸化アンモニウムによって酸化されたE-コニフェリルアルコールからの産物分布
に対するアミノ酸の効果を調べる

(FAD) とのインキュベーションの効果を調査した。なぜなら、酵素補因子としてのそれらの役割に加えて、それらはまた、種々の有機基質を酸化し得るからである (T.C. Bruice, Acc. Chem. Res. 13:256(1980))。E-[9-³H]コニフェリルアルコールを、それぞれ FAD および FAD とともに、48 時間インキュベートした。FAD を得るために、ヘビ (Naja naja atra, Fomosan コブラ) 毒を FAD の溶液 (4.0 × 10⁻⁵ mol ml⁻¹) に添加し、そして 30℃ にて 30 時間のインキュベーションの後、酵素的に形成した FAD を、Centrificon 10 (Amicon) マイクロコンセントレーターを通してフィルターによって、タンパク質混合物から分離した。どの場合も、E-コニフェリルアルコール酸化は、FAD よりも FAD の存在下でより迅速であった。FAD と FAD との間の E-コニフェリルアルコール酸化の触媒速度のこれらの差異は予測されなかったが、一致したパターンが確認された：以前のように優性である (±) デヒドロコニフェリルアルコールとともにラセミグリグナ産物を得た。ディリジエントタンパク質の存在下で経時変化を反復した場合、本質的に (+) ビノレシノール形成のみを生じる、立体選択性における劇的な変化が観察された。再び、E-コニフェリルアルコール消費速度は、ディリジエントタンパク質調製物における微量な残留酸化力 (10 時間にわたって < 5%) のために調整した場合、形成した二量体の総量として、[FAD] および [FAD] にのみ依存した。E-コニフェリルアルコールが全て消費される場合、対応するグリグナ二量体は、時間の関数として酸化的变化し始め得る；特に、E-コニフェリルアルコールが全て消費された後、オーブン溶液において、FAD は続いてビノレシノールを酸化し得る。

基質特異的立体選択性の調査。カップリング立体選択性は基質特異性であった。E-p-[9-³H]クマリル (4 μmol ml⁻¹, 44.5 kBq) または E-[8-³H]シナピル (5 inapyl) アルコール (4 μmol ml⁻¹, 8.3 kBq) (これらは、芳香環のメトキシ基置換体によってのみ E-コニフェリルアルコールと異なる) は、ディリジエントタンパク質の存在または非存在下で、それぞれ FAD および過酸化二硫酸アンモニウムとともに 6 時間インキュベートした場合、立体選択的産物を生じた。インキュベ-

E-コニフェリルアルコールの (+) ビノレシノールへの立体特異的変換における他の酵素添加剤の効果。E-コニフェリルアルコール (4 μmol ml⁻¹, 29.3 kBq) の、フラビンモノヌクレオチド (FMN) およびフラビンアデニンジヌクレオチド

$\mu\text{mol ml}^{-1}$ 44, 5k8q) または $E-[8-^{14}\text{C}]$ シナピルアルコール ($4 \mu\text{mol ml}^{-1}$, 8, 3k8q) を基質として使用し、そして 30°C にて 6 時間のインキュベーションの後、反応混合物を、放射化学的キャリアの添加なしに、EtOAc で抽出した。E-シナピルアルコールは、容易にカッピングされて、シリリングガレジオールを産出したが、キラル HPLC 分析により、得られる産物が、どの場合においてもラセミであることが明らかになった (表 2)。興味深いことに、それ自体により、78kD デイリジエントタンパク質製剤は、低レベルの二量体形成を触媒した (以前に記載) が、ラセミ (±)-シリリングガレジオール形成のみを生じた。これはおそらく、タンパク質製剤中に存在する微量な未確した残留酸化力の結果である。

類似の様式において、立体選択的カッピングは、E-P-クマリルアルコールを基質として用いては観察されなかった。すなわち、E-コニフェリルアルコールのみが、デイリジエントタンパク質の存在下で、立体選択的カッピングを受ける。将来、デイリジエントタンパク質の E-コニフェリルアルコールについての与えられた顕著な基質特異性が *Eucommia ulmoides* において (+)-シリリングガレジオールを与える基質特異性とどのように異なるか、を決定することが非常に興味深い (T. Deyama, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2993 (1983))。

表 2

E-シナピルアルコールのカッピングにおける
デイリジエントタンパク質の効果 (6 時間アッセイ)

	消費した基質 量 (6 時間における E-シナピルアルコール 770 $\mu\text{mol ml}^{-1}$)		ラセミ シリリングガレジオール (±) $\mu\text{mol ml}^{-1}$	
	存在	570 \pm 100	290 \pm 40	
FMN	存在	610 \pm 110	340 \pm 40	
(0.5 $\mu\text{mol ml}^{-1}$)	存在	1400 \pm 120	1020 \pm 40	
試験に 二酸化アセトン	存在	1570 \pm 10	1060 \pm 30	
(10 $\mu\text{mol ml}^{-1}$)	存在	1170 \pm 10	50 \pm 10	
シリリングガレジオール	存在			

本発明者らは、立体選択的カッピングの任意の特定の機構に束縛されることを意図しないが、3 つの別々の可能性が考えられ得る。最もありそうなのは、オキシダーゼまたは酸化剤が、E-コニフェリルアルコールからフリーラジカル種を生成すること、および後者が、カッピングの前にデイリジエントタンパク質に結合する真の基質であるということである。他の 2 つの可能性は、E-コニフェリル分子がデイリジエントタンパク質に結合および配向し、それにより、(+)-ピノレシノール形成のみが、続く酸化カッピングにおいて生じることを確認することとを必要とする：これは、両方の基質フェノールとドロキシシル基が暴露され、その結果それらが、オキシダーゼまたは酸化剤によって容易に酸化され得る場合、または、電子転移機構が、オキシダーゼまたは酸化剤とデイリジエントタンパク質の電子受容部位との間で作動性である場合、生じ得る。

3 つの別々の機構の間で、3 つの系統の証拠は、デイリジエントタンパク質によるフェノキシラジカル中間体の「捕捉」を示唆する。第 1 に、基質消費および産物形成の両方の速度は、デイリジエントタンパク質の存在によって、あまり影響されない。フリーラジカル中間体の捕捉が作動可能な機構である場合、デイリ

ジエントタンパク質は、コニフェリルアルコールの単一電子の酸化が速度決定性である場合、カッピング特異性に影響を及ぼすのみである。第 2 に、電子転移機構は現在除外される。なぜなら、本発明者らは、補助オキシダーゼまたは酸化剤の存在または非存在下のいずれにおいても、酸化条件下で、新規な紫外-可視発色団を観察しなかったからである。第 3 に、一次速度論データは (実施例 4 に議論するように)、E-コニフェリルアルコールの (+)-ピノレシノールへの変換を、デイリジエントタンパク質単独で、および種々のオキシダーゼまたは酸化剤の存在下で特徴づける、ミカエリス定数 (K_m) および最大速度 (V_{max}) の公式値に基づいてフリーラジカル捕捉の概念を指示する。

実施例 4

デイリジエントタンパク質および酸素添加剤の存在下における
E-コニフェリルアルコールの (+)-ピノレシノールへの変換の
速度論的特徴付け

アッセイを、実施例3に記載のように、一連のE-[9-³H]ニコフェリルアルコール濃度 ($8.00 \pm 0.13 \mu\text{mol ml}^{-1}$ との間、 $7.3\text{MBq mole}^{-1}\text{iter}^{-1}$) を、ディリジエントタンパク質 (770pmol ml^{-1}) 単独で、そしてForsythiaラッカーゼ (2.1pmol ml^{-1})、画分III ($12 \mu\text{g タンパク質 ml}^{-1}$)、またはFMN ($0.5 \mu\text{mol ml}^{-1}$) の存在下でインキュベートすることで行った。ディリジエントタンパク質を有するアッセイを、FMNの存在または非存在下において、30°Cにて1時間インキュベートし、一方、ディリジエントタンパク質の存在または非存在下におけるForsythiaラッカーゼまたは画分IIIでのアッセイを、30°Cにて15分間インキュベートした。ディリジエントタンパク質によるフリーラジカルの捕捉が作動可能な機構である場合、得られるミカエリス-メンテンパラメーターは、其の値とは異なる公式値を示すのみである。なぜなら、E-ニコフェリルアルコールの(+)-ビノレシノールへの変換の間の最も高いフリーエネルギー中間体状態は未知であり、そして基質の濃度とオープン溶液中の対応する中間体フリーラジカルの濃度との間の関係は、描述されていないからである。

これらの条件を考慮して、本発明者らは、ディリジエントタンパク質調製物に

ついで、公式の K_m および V_{max} 値を評価した。初めに記したように、E-ニコフェリルアルコールからの(+)-ビノレシノールおよびE-シナピルアルコールからのラセミ(+)-シリンガレジノールの両方の低レベルの形成を生じ得る。なぜか、夾雑する酸化能力の追跡のためである。この調製とともに(表3)、 $10 \pm 6 \text{ mM}$ の公式 K_m および $0.02 \pm 0.02 \text{ mol s}^{-1}$ の V_{max} を得た。しかし、画分III、ラッカーゼ、およびFMNの添加とともに、公式 K_m 値 (mM) は、それぞれ、 1.6 ± 0.3 、 0.100 ± 0.003 、および 0.10 ± 0.01 に減少し、一方 V_{max} 値は、補助オキシダーゼ/酸化剤のこれらの濃度で、はるかに低く影響された。

公式 K_m および V_{max} 値を、3つのラセミシグナンへのE-ニコフェリルアルコール変換の点から、ラッカーゼおよび画分IIIオキシダーゼについて計算した。しかし、78kDタンパク質への直接的比較はなし得ない。なぜなら、公式 K_m 値は、対応するオキシダーゼにのみ関与するからである。完全性のために、 K_m (mM) および V_{max} (mol s^{-1} 酵素) は以下のようであった：ラッカーゼに関して、(+)-

エリスロ/スレオグアヤシルグリセロール8-O-4'-ニコフェリルアルコールエステルについて、 0.200 ± 0.001 および 3.9 ± 0.2 、(+)-デヒドロジニコフェリルアルコールについて、 0.300 ± 0.003 および 13.1 ± 0.6 、ならびに(+)-ビノレシノールについて、 0.300 ± 0.002 および 7.54 ± 0.50 ；画分IIIオキシダーゼ (80kDa)の天然の分子量を有することが確認された) に関して、(+)-エリスロ/スレオグアヤシルグリセロール8-O-4'-ニコフェリルアルコールエステルについて、 2.2 ± 0.3 および 0.20 ± 0.03 、(+)-デヒドロジニコフェリルアルコールについて、 2.2 ± 0.2 および 0.7 ± 0.1 、ならびに(+)-ビノレシノールについて、 3.7 ± 0.7 および 0.6 ± 0.1 。

これらの一次速度論パラメーターは、ディリジエントタンパク質が、画分III、ラッカーゼ、およびFMNの存在下でE-ニコフェリルアルコール消費速度に実質的に影響を及ぼさないという発見と調和する。両セットの結果は、ディリジエントタンパク質が、フリーラジカル中間体を捕捉することによって機能し、次いで立体選択性カップリングを受けるという作用仮説にともなうに従う。

表 3

E-ニコフェリルアルコールからの(+)-ビノレシノール形成の間の
ディリジエントタンパク質 (770pmol ml^{-1}) についての
公式 K_m および V_{max} 値における種々の酸化剤の効果

オキシダーゼ/酸化剤	公式 K_m (mM)	V_{max} (mol s^{-1} mol ⁻¹ タンパク質)
ディリジエントタンパク質		
画分 III ($12 \mu\text{g protein ml}^{-1}$)	10 ± 6	0.02 ± 0.02
ラッカーゼ ($2.07 \text{ pmol ml}^{-1}$)	1.6 ± 0.3	0.10 ± 0.03
FMN ($0.5 \mu\text{mol ml}^{-1}$)	0.100 ± 0.003	0.0600 ± 0.0002
	0.10 ± 0.01	0.024 ± 0.001

実施例 5

Forsythia intermedia由来のディリジエントタンパク質cDNAのクローニング
植物材料 - Forsythia intermedia植物を、Bailey's Nursery (var. Lynwood Co
rd, St., Paul, MN) から入手し、そしてワシントン州立大学温室において施設維

持するか、または地方群落からの寄贈であったかのいずれかであった。

材料-使用したすべての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLCグレードであった。Tad熱安定性DNAポリメラーゼをPromegaから入手し、一方、制限酵素を、Gibco BRL (HaeIII)、Boehringer Mannheim (SmaI)、およびPromega (TaqI) から入手した。p178 lucTベクターおよびコンピテントNovaBlue細胞をNovagenから購入し、そして放射標識ヌクレオチド ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) をDuPont NENから購入した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプ

ライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II[®]キット (G10 101 Inc.) を、1.5% アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定したゲル精製DNA濃度で、PCRフラグメントの精製のために使用した。

装置-UV (OD₂₆₀でのRNAおよびDNA決定を含む) スペクトルを、Landa 6 UV/VIS分光光度計で記録した。Temptonic IIサーモサイクラー (ThermoLyne) を、すべてのPCR増幅のために使用した。配列決定のためのDNAの精製は、QIAquick Plusプラスミド精製システム (QIAGEN) を使用し、続いてPEG沈降を行い (Sambrook J., Fritsch, E.F., およびManiatis, T. (1994) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)、DNA配列を、Applied Biosystems Model 373A自動配列決定機を用いて決定した。アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosystems Nバク質配列決定機を用いて、製造業者の説明書に従って得た。

ディリジェントタンパク質アミノ酸配列決定-ディリジェントタンパク質N末端アミノ酸配列 (配列番号1) を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosystemsタンパク質配列決定機を用いて、精製タンパク質から得た。トリプシン消化のために、精製酵素 (150μmol) を、0.1M Tris-HCl (50μl, pH8.5, Boehringer Mannheim, 配列決定グレード) 中に懸濁し、77.5μl中8Mの最終濃度まで尿素を添加した。混合物を、15分間50℃にてインキュベートし、続いて100mMヨードアセトアミド (2.5μl) を添加し、その全体を、室温にて15分間維持した。次の

で、トリプシン (20μl中1μg) を添加し、混合物を24時間37℃にて消化し、続いてTFA (4μl) を添加して、酵素反応を停止した。得られた混合物を逆相HPLC分析 (C-8カラム, Applied Biosystems) に供し、これを、0から100%アセトニトリル (0.1% TFA中) までの2時間にわたる直線勾配で、0.2ml/分の流速にて溶出し、280nmで検出した。個々のオリゴヌクレオチドピークを含む画分を手動で回収し、そしてアミノ酸配列決定に直接供した (配列番号2~7)。

Forsythia intermedia stem cDNAライブラリー合成-全RNA (約300μg) の新鮮な量) を温室生長Forsythia intermedia植物 (Var. Lynwood Gold) の若い緑色茎から得た (Dong, Z.D., およびDunstan, D.I. (1996) Plant Cell Reports 15:516-

521)。Forsythia intermedia stem cDNAライブラリーを、5μgの精製ポリA⁺ mRNA (Oligotex-d⁺ Suspension, QIAGEN) を用いて、2AP-cDNA[®]合成キット、Uni-ZAP[™]XRベクター、およびGigaPack[®] II Goldパッケージング抽出物 (Stratagen

e) とともに構築し、一次ライブラリーについて1.2×10⁶ PFUの力価を得た。増幅したライブラリー (1.2×10⁶ PFU/ml、全量158ml) (Sambrook, Jら、前出) の一部 (30ml) を使用して、PCRのための精製cDNAライブラリーDNAを得た (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., およびStruhl, K. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, 2つの巻, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley&Sons, NY)。

ディリジェントタンパク質DNAプロンプ合成-N末端および内部ペプチドアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを構築した。精製F.inte mediac DNAライブラリーDNA (5 ng) を、100μl PCR反応物 (10mM Tris-HCl (pH 9.0)、50mM KCl、0.1% Triton X-100、2.5mM MgCl₂、0.2mM各dNTP、および2.5 ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) 中、プライマー-PSINT1 (配列番号8) (100pmol)、およびプライマー-PSI7R (配列番号11) (20pmol)、プライマー-PSI2R (配列番号10) (20pmol)、またはプライマー-PSI1R (配列番号9) (20pmol) のいずれかとともに、テンプレートとして使用した。PCR増幅を、サーモサイクラーにおいて、以下のように行った: 1分94℃、2分50℃、および3分72℃の35サイクル; 72℃にて5分、および最終サイクルの後4℃にて無制限維持。1つのプライマー

、テンプレートのみ、およびプライマーのみの反応を、コントロールとして行った。PCR産物を、1.5%アガロースゲルに溶解し、ここで一本のバンド(それぞれ、約370bp、約155bp、または約125bp)が、各反応について観察された。

増幅したバンドのヌクレオチド配列を決定するために、5つの100 μ lのPCR反応を、PSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)、PSINT1(配列番号8)およびPSI2R(配列番号10)、ならびにPSINT1(配列番号8)およびPSI1R(配列番号9)のプライマー対を用いて上記のように、行った。各プライマー対からの5つの反応物を濃縮し(Microcon 30, Amicon Inc.)、そしてTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA; 2 \times 200 μ l)で洗浄し、続いて、PCR産物をTE緩衝液中

(2 \times 50 μ l)に回収した。これらを、調製用1.5%アガロースゲル中で分離した。次いで、各ゲル精製PCR産物(約0.2 μ mol)を、pT78blueTベクターに連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNovaBlue細胞に形質転換した。インサートサイイズを、急速煮沸溶解およびPCR技術(R20マーおよびUI9マープライマーを用いる)を用いて、製造業者の説明書に従って決定した。制限分析を行い、前述のプライマー対を利用する各反応からのすべてのインサートが、同一であるかどうか、以下のように決定した: 100 μ l PCR反応物(R20マー(配列番号74)およびUI9マー(配列番号75)で増幅した目的のインサート)のうち各20 μ lに、4ユニットのHaeIII、1.5ユニットのSmaI、または5ユニットのTaqI制限酵素を添加した。制限消化を、HaeIIIおよびSmaIについては37℃にて、ならびにTaqI反応については65℃にて60分進行させた。制限産物を、1.5%アガロースゲルに溶解し、試験した各インサートについて1つの制限グループを得た。PSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)からの5つの組換えプラスミド(pT7PSI1-pT7PSI5と称す)、およびPSINT1(配列番号8)およびPSI2R(配列番号10)からの2つの組換えプラスミド(pT7PSI6およびpT7PSI7と称す)PCR産物を、DNA配列決定のために選択した; すべてが、同じオーブンリーディングフレーム(ORF)(配列番号69)を含んだ。次に、ディリジェントタンパク質プローブを、以下のよう

に構築した: 5つの100 μ l PCR反応を、10ngのpT7PSI1 DNA(配列番号69)で、プライマーPSINT1(配列番号8)およびPSI7R(配列番号11)を用いて上記のように

行った。ゲル精製pT7PSI1インサート(50ng)を、Pharmaciaの"QuickPrime"キットおよび $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ とともに、キット説明書に従って使用して、放射性標識プローブを生成した(0.1ml中)。これを、BioSpin6カラム(Bio-Rad)を通して精製し、そしてキャリアDNA(0.5mg/ml剪断サケ精子DNA(Sigma)、0.9ml)に添加した。

ライブラリースクリーニング-600,000PFUのF.intermedia増幅cDNAライブラリーを、一次スクリーニングのために、Stratageneの説明書に従ってプレートした。ブラークを、Magna Nylon円形膜(Micron Separations Inc.)にプロットした。

次いでこれを風乾した。膜をWhatman[®]3MM Chr紙の2層の間に置いた。cDNAライブラリーファージDNAを膜に固定し、そして100℃にて2分間迅速な排気を行いオートクレープすることによって、1段階で変性させた。膜を、6 \times 標準クエン酸生埋食塩水(SSC)および0.1% SDS中で37℃にて30分間洗浄し、そして結晶化用ディッシュ(150 \times 75mm)において、予熱した6 \times SSC、0.5% SDS、および5 \times Denhardt試薬(ハイブリダイゼーション溶液、300ml)中で57 \sim 58℃にて穏やかに振盪しながら、5時間ブレハイブリダイズした。 $[\text{P}]$ 放射標識したプローブを変性し(煮沸、10分)、素早く冷却し(氷、15分)、そして結晶化用ディッシュ(190 \times 75mm)中の予熱した新鮮なハイブリダイゼーション溶液(60ml、58℃)に添加した。次に、ブレハイブリダイズした膜をこのディッシュに添加した。次いでこれを、プラスチックスラップで覆った。ハイブリダイゼーションを、57 \sim 58℃にて、穏やかに浸透しながら、18時間行った。膜を、4 \times SSCおよび0.5% SDSにおいて、5分間室温にて洗浄し、2 \times SSCおよび0.5% SDSに移し(室温)、そして57 \sim 58℃にて、穏やかに浸透しながら、20分間インキュベートし、プラスチックスラップで覆って乾燥を防ぎ、そして最後に増感スクリーンで-80℃にて24時間、Kodak X-Omat ARフィルムに暴露した。20のポジティブブラークを、上記のハイブリダイゼーション条件での2回以上のスクリーニングによって精製した。

ディリジェントタンパク質cDNA含有ファージミドインピが切除および配列決定

複製cDNAクローンを、stratageneのインピボ切除プロトコルに従って、ファージから得た。ディリジエントタンパク質をコードするいくつかの異なるcDNAの両端を、重複配列決定プライマーを用いて完全に配列決定した。2つの異なるcDNAを同定し、pPSD-F11 (配列番号12) およびpPSD-F12 (配列番号14) と命名した。配列分析: DNAおよびアミノ酸配列分析を、UnixベースのCGC Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version8, 1994年9月、Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, USA53711; Rice P. (1996) Program Manual for the ECGG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge CB10 1 Rq, England) およびthe Expasy World Wide Web分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

実施例 6

Spodoptera frugiperdaにおける機能的ディリジエントタンパク質の発見

Escherichia coli において機能的ディリジエントタンパク質を発見する試みは失敗した。従って、本発明者らは、バキュロウイルス発現系を利用して、*Spodoptera frugiperda* において、ディリジエントタンパク質を発見した。F. intermediaにおけるディリジエントタンパク質 (PSD) のための全長1.2kb cDNAクローン (これは、5'および3'未翻訳領域の両方を含む) を、プラスミドpSD-F11 (配列番号12) 由来のpBlueScript (Stratagene) から、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびXhoIを用いて切除した。この1.2kbフラグメントを、バキュロウイルス移入ベクター-pBlueBac4 (Invitrogen, San Diego, CA) のマルチクローニングサイトににおけるこれらの同じ制限部位に直接サブクローン化した。これは、6.0kb構築物pB84/PSDを産生し、これはディリジエントタンパク質cDNAの開始コドンで開始される翻訳との非融合ディリジエントタンパク質を作製する。次いで、この構築物を線状化Bac-N-Blue DNA (Invitrogen) と、*Spondoptera frugiperda* Sf9細胞に、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクションの技術によって同時トランスフェクトして、同種組換えの手段によって産生した。組換えAutographa californica核多核体ウイルス (AcMNPV) DNA Bac-N-Blueディリジエントタンパク質

(B8/PSD) を、Invitrogenによって記載される手順に従ってブランクから複製した。最終組換えAcMNPV-B8/PSDは、多核体プロモーター制御下でPSD遺伝子を含む、そして組換えウイルスの複製に必要な必須配列を含んだ。ディリジエントタンパク質を昆虫細胞培養物において首尾良く発現されたことを検証するために、AcMNPV-PSD組換えウイルス高力価ストックで感染した対数期Sf9細胞を使用して、異種タンパク質産生を得た。最大のディリジエントタンパク質収率は、感染後48〜70時間までに生じた。SDS-PAGEおよび(+)-ビノレシノール形成活性によって決定される場合、タンパク質が培地に分泌され、そして元来Forsythia intermediaから単離された固有のタンパク質に対応する分子量および活性を示すことを見いだした。

実施例 7

ディリジエントタンパク質クローンの

Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからの単離

Forsythiaディリジエントタンパク質cDNAのコード領域 (psd-F11 (配列番号12)) を使用して、Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからのcDNAライブラリーをスクリーニングした。条件および方法は、ハイブリダイゼーションを45〜50℃にて行った以外は、実施例5に記載の通りであった。2つのディリジエントタンパク質cDNAを、Tsuga heterophyllaから単離し (配列番号16、18)、そして8つのディリジエントタンパク質cDNAを、Thuja plicataから単離した (配列番号20、22、24、26、28、30、32、34)。

実施例 8

ビノレシノール/ラリシノールレダクタゼの

Forsythia intermediaからの複製

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Bailey's Nursery (var. Lynwood Gold, St. Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持されるか、または地成集落からの贈与物のいずれかであった。

材料。使用した全ての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLCグレードであった。未標識の(+)-ビノレシノールおよび(+)-ラリシノールを、記載のよう

に合成した (Katayama, T.ら, *Phytochemistry* 32:581-591(1993))。[4R-3H]NADPH を、以前に報告されたように、Moranらの手順 (Moran, R.G.ら, *Anal. Biochem.* 13 8:196-204(1984)) の改変 (Chu, A.ら, *J. Biol. Chem.* 268:27026-27033(1993)) に よって得、そして[4R-2H]NADPHを、AndersonおよびLinにしたがって調製した (Anderson, J.A.およびLin B.K., *Phytochemistry* 32:811-812(1993))。酵母グル コース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (DX型, 22.32mmol h⁻¹ mg⁻¹) および 酵母ヘキソキナーゼ (F300型, 15.12mmol h⁻¹ mg⁻¹) をSigmaから購入し、そしてジ ヒドロ葉酸レダクターゼ (Lactobacillus casei, 33.48mmol h⁻¹ mg⁻¹) をBiopu re Co.から得た。Affi-Gel Blue Gel (100~200メッシュ) およびBio-Gel HT Hy droxyapatiteをBio-Radから購入し、一方、Phenyl Sepharose CL-4B,

MonoQ HR 5/5, MonoP HR 5/20, Superose 6, Superose 12, Superdex 75, PD-10 カラム、分子量標準、およびPolybuffer 74を、Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.から得た。アデニン2',5'-ニリン酸SepharoseおよびReactive Yellow 3 A garoseを、Sigma Chemical Co.から得た。

器械。H核磁気共鳴スベクトル (300および500MHz) を、それぞれBruker AMX3 00およびVarian VR5005スベクトロメータで記録し、テトラメチルシラン (内部 標準) からの低磁場が報告される化学シフト (δ ppm) を有する溶媒としてCDCl₃ を用いた。UV (OD₂₆₀)でのRNAおよびDNA決定を含む) および質量スペクトルを、 それぞれ、Lambda 6 UV/VISおよびVG 7070E (イオン化電圧70eV) 分光度計で 得た。高速液体クロマトグラフィーを、逆相 (Waters, Nova-pak C18, 150×3.9 mm内径) またはキラル (Daicel, Chiralce 100またはChiralcel OC, 240×4.6mm 内径) カラムのいずれかを用いて行い、280nmで検出した (Chu, A.ら, *J. Biol. Ch em.* 268:27026-27033(1993))。放射活性サンプルを、Ecolume (ICN) において分 析し、そして液体シンチレーションカウンタ (Packard, Tricarb 2000 CA) を 用いて測定した。アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出を備えたApplied Biosys temsタンパク質配列決定機を用いて、製造業者の説明書に従って得た。

酵素アッセイ。ピノレシノールおよびラリシレシノールレダクターゼ活性を、 (-)-[³H]ラリシレシノールおよび(-)-[³H]セコイソラリシレシノールの形成をモ

ニターすることによってアッセイした (Chu, A.ら, *J. Biol. Chem.* 268:27026-270 33(1993))。

簡単に、ピノレシノールレダクターゼ活性についての各アッセイは、(±)-ピノレシノール (MeOH中 5 mM, 20 μ l)、精製段階に対応する酵素調製物 (100 μ l)、および緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH8.0, 110 μ l) からなる。酵素反応を、[4R-³H]NADPH (10mM, 20 μ l)の二重蒸留H₂O中6.79kBq/mmol) の添加によって開始 した。振盪しながら30℃にて30分のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射化学キャリアとして(±)-ラリシレシノール (20 μ g) および(±)-セコ イソラリシレシノール (20 μ g) を含むEtOAc (500 μ l) で抽出した。遠心分離後 (13,800×g, 5分)、EtOAc可溶物を除去し、そして抽出手順を反復した。各ア セイについて、EtOAc可溶物を、液体シンチレーションカウンタを用いるその

放射活性の決定のために、除去したアリコート (100 μ l) と合わせた。合わせた EtOAc可溶物の残留物を、減圧下でエバポレートして乾燥し、H₂O中のMeOH/3% 酢酸 (30:70, 100 μ l)に再構成し、そして逆相およびキラルカラムHPLCに供した。コントローラーを、変性 (10分間煮沸した) 酵素または基質としての(±)-ピノ レシノールの非存在下のいずれかを用いて行った。

ラリシレシノールレダクターゼ活性を、(-)-[³H]セコイソラリシレシノールの 形成をモニターすることによってアッセイした。これらのアッセイを、(±)-ラ リシレシノール (MeOH中 5 mM, 20 μ l) を基質として使用し、放射化学キャリヤ として(±)-セコイソラリシレシノール (20 μ g) を添加した以外は、上記と同様 に行った。

酵素精製の一般的な手順。タンパク質精製手順を、他に示さない限りは、4℃ にて、280nmでモニターしながら、クロマトグラフィー溶出で行った。タンパク 質濃度を、Bradfordの方法 (Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* 72:248-254(1976)) によって、γグロブリンを標準として用いて決定した。ポリアクリルアミドゲル 電気泳動は、勾配 (4~15% Bio-Rad) ゲルを、変性および還元条件下で使用 し、これらは、Laemmliの緩衝液系 (Laemmli, U.K., *Nature* 227:680-685(1970)) において行った。タンパク質を、銀染色によって可視化した (Morrissey, J.H.

Anal. Biochem. 117:307-310(1981)。

粗抽出物の調製。F. intermediaの茎 (20kg) を採集し、3～6 cm切片に切断し、そして必要なきときまで-20℃で保存した。茎のバッチ (2kg) を、液体窒素中で冷凍し、そしてWaring Blendorで粉砕した。得られた粉末を、5 mMジチオスレイトールを含むリン酸カリウム緩衝液 (0.1M, pH7.0, 4 L) で均質化した。ホモジネートを、4層のチーズクロスを通して、10% (w/v) ポリビニルピロリドンを含むビーカーに濾過した。濾過物を遠心分離した (12,000×g, 15分)。得られた上清を、(NH₄)₂SO₄で分画し、40～60%飽和のタンパク質沈殿を、遠心分離 (10,000×g, 1時間) によって回収した。次に、ペレットを、5 mMジチオスレイトールを含む最小量のTris-HCl緩衝液 (20mM, pH8.0) (緩衝液A) に再構成し、そして緩衝液Aで平衡化したプレバック PD-10カラム (Sephadex G-25媒体) を用いて脱塩した。

アフィニティー (Affi Blue Gel) クロマトグラフィー。粗酵素調製物 (緩衝液A中191mg, 5mmol h⁻¹ mg⁻¹) を、緩衝液Aで平衡化したAffi Blue Gelカラム (2.6×70cm) に適用した。カラムを20mlの緩衝液Aで洗浄した後、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A中直鎖NaCl勾配 (300ml中1.5～5M) で、流速1ml分⁻¹にて溶出した。活性画分を、必要なき時まで保存した (-80℃)。

疎水性相互作用クロマトグラフィー (Phenyl Sepharose)。解凍後、Affi Blueクロマトグラフィー工程から得られた10の調製物 (150mg, 51mmol h⁻¹ mg⁻¹) を合わせ、そして5M NaClを含む緩衝液Aで平衡化したPhenyl Sepharoseカラム (1×10cm) に適用した。カラムを、2粒容積の同じ緩衝液で洗浄した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A中のNaClの減少濃度の直線勾配 (40ml中5～0M) を用いて、流速1ml分⁻¹にて溶出した。ビノレシノール/ラリシレシノール還元を触媒する画分を合わせて、そしてブールした。

ヒドロキシアパタイトIクロマトグラフィー。Phenyl Sepharose精製工程からの活性タンパク質 (31mg, 91mmol h⁻¹ mg⁻¹) を、5 mMジチオスレイトールを含む10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) (緩衝液B) で平衡化した、ヒドロキシ

アパタイトカラム (1.6×70cm) に適用した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) の直線勾配 (200ml中0.01～0.4M) で、流速1ml分⁻¹にて溶出した。活性画分を合わせた。次いで、緩衝液を、PD-10プレバックカラムを用いて、緩衝液Aと交換した。

アフィニティー (2'5'-ADP Sepharose) クロマトグラフィー。次に、ヒドロキシアパタイト精製工程から得られる酵素溶液 (6.5mg, 463mmol h⁻¹ mg⁻¹) を、2.5mM EDTAを含む緩衝液A (緩衝液) で事前に平衡化した、2'5'-ADP Sepharose (1×10cm) カラムにロードし、次いで、25mlの緩衝液Aで洗浄した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、緩衝液A中のNADP⁺の段階勾配 (10ml中0.3mM) で、流速0.5ml分⁻¹にて溶出した。(NADP⁺ (3mM) は、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を溶出しなかった。) NADP⁺の吸光度の影響で、280nmで溶解液を直接モニターするのは不可能であった。各画分についてのタンパク質濃度を、Bradford (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 7

2:248-254(1976)) に従って分光光学的に決定した。

ヒドロキシアパタイトIIクロマトグラフィー。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を示す2'5'-ADP Sepharoseカラムからの画分 (0.85mg, 1051mmol h⁻¹ mg⁻¹) を合わせ、そして緩衝液Bで平衡化した第2ヒドロキシアパタイトカラム (1×3 cm) に直接適用し、リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) の直線勾配 (45ml中0.01～0.4M) で、流速1ml分⁻¹にて酵素を溶出した。

アフィニティー (Affi Yellow) クロマトグラフィー。次に、第2ヒドロキシアパタイトカラム精製工程からの活性画分 (160μg, 7960mmol h⁻¹ mg⁻¹) を、緩衝液Aで平衡化した、Reactive Yellow 3 Agarose column (1×3 cm) に適用した。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、直鎖NaCl勾配 (100ml中0～2.5) で、流速1ml分⁻¹にて溶出した。

高速タンパク質液体クロマトグラフィー (Fast Protein Liquid Chromatography) (Superose 12クロマトグラフィー) -最高の活性を有するAffi Yellow精製工程からの合わせた画分 (50μg, 10,940mmol h⁻¹ mg⁻¹) をブールし、そしてCentricon 10微小濃縮器 (Amicon, Inc.) を用いて、1mlに濃縮した。次いで、酵

素溶液を、 $200\mu\text{l}$ ずつ、高速タンパク質液体クロマトグラフィーカラム (Superose 12, HR10/30) に適用した。ゲル濾過を、 20mM Tris-HCl (pH8.0)、 150mM NaCl、および 5mM ジチオサスレイトールを含む緩衝液において、流速 $0.4\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ にて行った。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、 12.8ml の移動相で溶出した。UVプロファイル (280nm での吸光度) と一致する活性な画分をブールし ($20\mu\text{g}$, $15,300\text{nmol}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)、そして脱塩した (PD-10プレバックカラム)。

前述の精製プロトコルは、(+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼの3060倍の精製をもたらした。フェニルプロパノイド代謝に関与する多くの酵素についてのよう、タンパク質は非常に少ない含有量である。すなわち、 20kg の F. intermedia の茎は、精製 (+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼを約 $20\mu\text{g}$ しかもたらなかった。

実施例 9

Forsythia Intermedia からの精製ビノレシノール/ラリシレシノールレダクター

ゼの特徴付け

等電点および pI 決定。精製プロトコルの全段階において、(+)-ビノレシノール/ (+)-ラリシレシノールレダクターゼ活性は同時溶出した。この観察を考えると、タンパク質の1つを超える形態が存在したかどうか (すなわち、タンパク質の1つの形態がビノレシノールの還元を触媒し、そしてそのタンパク質の別の形態がラリシレシノールの還元を触媒したかどうか) を明白に確認することが必須であった。この目的のため、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの等電点を、MonoP HR 5/20 FPLCカラムで等電点電気泳動することによって確立した。

Superose 12ゲル濾過カラム (実施例1) からの活性な画分をブールし、そして同じ緩衝液で平衡化したプレバック PD-10カラムを用いて、 25mM Bis-Tris (pH 7.1) で緩衝液交換した。このように得られた調製物を、等電点電気泳動カラムにロードし、そして $7.1\sim 3.9$ の pH 勾配を、溶出液として Polybuffer 74を用いて、流速 $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ にて形成した。各画分のアリコート ($200\mu\text{l}$) を、ビノレシノ

ール/ラリシレシノールレダクターゼ活性についてアッセイした。画分の残留物を使用して、pH 勾配を決定した。

分子量決定。ビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの MonoP HR 5/20 FPLCカラム調製物の、SDS-勾配ゲル電気泳動 ($4\sim 15\%$ ポリアクリルアミド) への適用によって、類似の見かけの分子量の2つのタンパク質バンドの存在が明らかになった。この分離を、MonoQ HR 5/5 FPLCマトリックスにおける陰イオン交換クロマトグラフィーを介して達成した。Superose 12精製工程 (実施例1) からブールした画分を、緩衝液 A で平衡化した MonoQ HR 5/5カラム (Pharmacia) に適用した。カラムを、 10ml の緩衝液 A で洗浄し、そしてビノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ活性を、緩衝液 A 中の直線 NaCl 勾配 (50mM 中 $0\sim 50\text{mM}$) で、流速 $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ にて溶出した。回収した画分のアリコート ($30\mu\text{l}$) を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、勾配 ($4\sim 15\%$ アクリルアミド) ゲルを用いて分析した。タンパク質を銀染色によって可視化した。活性画分 $34\sim 37$ ($27,760\text{nmol}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) および $38\sim 41$ ($30,790\text{nmol}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) を別々にブールし、そしてこれらを用いて特徴付けた。

変性条件下でこのように分離した2つのタンパク質バンドは、それぞれ、約 36 および約 35kDa の見かけ上の分子量を有した。2つのレダクターゼ形態の各々は、pI 約 5.7 を有した。

各レダクターゼイソ型の天然の分子量を、Superose 12、Superose 6、および Superdex 75ゲル濾過 FPLCカラムにおけるそれらの溶出挙動の、校正分子量標準の溶出挙動との比較を介して推定した。ゲル濾過を、実施例8に示すように行った。各レダクターゼについて、 $59,000$ の見かけ上の天然の分子量を、その溶出容量に基づいて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による約 $36,000$ および約 $35,000$ と比較して算出した。ゲル濾過および SDS-PAGE からの分子量の間の矛盾は未知のままであるが、天然のタンパク質はダイマーとして存在するようであるが、非対称形のモノマーとしてもまた存在し得、それによりその有効ストークス半径を変更すること (Cantor, C.R., および Shimmell, P.R., Biophysical Chemistry, 第1部, W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA (1980); Stellwagen, E., Met

hods in Enzymology 182:317-328(1990)) が、ヒトオレドキシニンレダクターゼ (Obong, J.E.ら, Biochemistry 32:7271-7277(1993)) および酵母メタロエンド ペプチドブチターゼ (Hrycyna, C.A., およびClarke, S., Biochemistry 32:11293-11301(1993)) について報告されたように、試験的に提案され得る。

pH至適および温度至適。ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのpH至適を決定するために、ゲルSuperose 12透過工程 (実施例8) からの酵素調製物を、緩衝液を、6.3~9.4のpH範囲の50mM Bis-Trisプロパン緩衝液で置換したことを除いて、標準的なアッセイ条件 (実施例8) を利用してアッセイした。pH至適は、pH7.4であることが見いだされた。

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼの温度至適を、4℃~80℃の範囲において、標準的なアッセイ条件 (実施例8) 下で、ゲル透過工程 (実施例8) からの酵素調製物を利用して実験した。至適pHで、レダクターゼ活性についての温度至適を、約30℃であることを確立した。

反応速度論パラメーター。速度研究を行い、2つのレダクターゼイソ型が別々の還元を触媒するかどうか (すなわち、それぞれ、(+)-ピノレシノールから(+)-

ラリシレシノール、および(+)-ラリシレシノールから(-)-セコイソラリシレシノールの変換)、または基質として(+)-ピノレシノールまたは(+)-ラリシレシノールのいずれかへの優先性を提示するかどうかを確認した。最初の速度研究を、酵素の2つのイソ型を別々に利用し、そして基質として(+)-ピノレシノールおよび(+)-ラリシレシノールの両方を別々に使用して行った。最初の速度研究を、3連の実験において、5 mMジチオスレイトールを含む50mM Bis-Trisプロパン緩衝液 (pH7.4)、純粋な酵素 (MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー後)、定常NA DHF濃度 (80 μM) での10の異なる基質濃度 (8.8~160 μM) を用いて行った。イオンキューションを、30℃にて10分間 (直線速度論範囲内) 行った。反応速度論パラメーターを、Lineweaver-Burkプロットから決定した。

重要なことに、反応速度論パラメーターは、酵素の35kDaおよび36kDa形態の両方について本質的に同じであった (すなわち、ピノレシノールについての K_m 、酵素の35kDa形態について $27 \pm 1.5 \mu M$ 、および酵素の36kDa形態について $23 \pm 1.3 \mu M$

;ラリシレシノールについての K_m ：酵素の35kDa形態について $121 \pm 5.0 \mu M$ 、および酵素の36kDa形態について $123 \pm 6.0 \mu M$)。類似の様式において、見かけ上の最大速度 (タンパク質の $\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$ として表される) もまた、本質的に同一であった (すなわち、ピノレシノールについての V_{max} ：酵素の35kDa形態について 16.2 ± 0.4 、および酵素の36kDa形態について 17.3 ± 0.5 ; ラリシレシノールについて：酵素の35kDa形態について 25.2 ± 0.7 、および酵素の36kDa形態について 29.9 ± 0.7)。従って、全ての入手可能な証拠は、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼが、2つのイソ型として存在し、その各々が同基質の還元を触媒し得ることを示唆する。この還元がどのように行われるか (すなわち、両還元が、並行になされるか、キノンまたはフラノ環形態のいずれかにおいてなされるかどうか)、より豊富なタンパク質供給源を用いるさらなる研究が待たれる。

(+)-[7'R',4'H]ラリシレシノールの酵素形成。2つの(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼイソ型が、本質的に同一の触媒特徴を示したので、Sephrose 12酵素調製物 (実施例8) (両イソ型を含む) を使用して、水素化物移入の立体特異性を実験した。適したストラテジーは、(+)-ピノレシノールの選

元のための補因子としてNADPHを用いる選択的重水素標識を利用し、酵素産物 (+)-ラリシレシノール) を、 1H NMRおよび質量分析によって分析した。従って、(+)-ピノレシノールの溶液 (MeOH中5.2mM, 4 ml) を、Tris-HCl緩衝液 (20mM, pH8.0, 5 mM) ジチオスレイトールを含む、22mM) に添加し、そしてAndersonおよびLinの方法 (Anderson, J.A., およびLin B.K., Phytochemistry 32:811-812(1993)) を介して立体特異性重水素標識化[4R',4'H]NADPH (H_2O 中20mM, 4 ml) を調製し、その全体を酵素調製物 (20ml) に添加した。振盪しながら30℃にて1時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、EtOAc (2 x 50ml) で抽出した。EtOAc可溶性画分を合わせ、飽和NaCl (50ml) で洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、そして減圧下でエバポレートして乾燥させた。得られる抽出物を、最小量のEtOAcに再溶解し、シリカゲルカラム (0.5 x 7 cm) に適用し、そしてEtOAc/ヘキサン

(1:2) で溶出した。酵養産物を含む画分を合わせ、そしてエバポレートして乾燥させた。

酵養産物を、重水素によるその置換に起因する δ 2.51ppmでの7'-プロポロプロトンの消滅によって、そしてC-7での1つの重水素原子の存在に対応する (m/z) 361 (M+1) でのその分子イオンによって証明されるように、(+)-[7'-R²H]ラリシレシノールであることを確認した。

¹H NMR (300 MHz) (CDCl₃): 2.39 (m, ¹H, C9H), 2.71 (m, ¹H, C8H), 2.88 (d, ¹H, J7S,8=5.0 Hz, C7HS), 3.73 (dd, ¹H, J8,9=7.0 Hz, J9,9'=8.5 Hz, C9'HD), 3.76 (dd, ¹H, J8,9S=6.5 Hz, J9R,9S=8.5 Hz, C9HS), 3.86 (s, ¹H, OCH₃), 3.88 (s, ¹H, OCH₃), 3.92 (dd, ¹H, J8,9R=6.0 Hz, J9R,9S=9.5 Hz, C9'HR), 4.04 (dd, ¹H, J8,9'=7.0 Hz, J9,9'=8.5 Hz, C9'HD), 4.77 (d, ¹H, J7,8=6.6 Hz, C7H), 6.68 - 6.70 (m, ¹H, AH), 6.75 - 6.85 (m, 4H, AH); MS m/z (%): 361 (M+1, 71.2), 360 (M+, 31.1), 237 (11.1), 153 (41.5), 152 (20.2), 151 (67.0), 138 (100), 137 (71.1).

従って、(+)-ピノレシノールから(+)-ラリシレシノールへの水素化物移入は、(+)-ラリシレシノールの7'-プロポロの水素位置のみを重水素化される様式において生じた。類似の結果が、(+)-ラリシレシノールの(-)-セコイソラリシレシノールへの変換についても観察され、それにより、全体の水素化物移入は、完全に立体特異性であることが確認された。

実施例10

Forsythia intermediaから精製した

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列分析

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのアミノ酸配列決定。(+)ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼN-末端アミノ酸配列を、オンラインHPLC検出器を備えたApplied Biosystemsタンパク質シーケンサーを用いて、精製タンパク質の各々および両方の混合物から得た。N-末端配列は、両アイソフォームについて同一であった (配列番号36)。

トリブリン消化のために、Sephacrose 12カラムから精製した酵素 (実施例8) の150pmolを、0.1M Tris-HCl (50 μ l, pH8.5) に懸濁し、尿素を添加して、77.5 μ lにおける最終濃度を8Mにした。混合物を50°Cにて15分間インキュベートし、

次いで100mMヨードアセトアミド (2.5 μ l) を添加し、その全体を室温にて15分間維持した。次いで、トリブリン (20 μ l中1 μ g) を添加し、混合物を37°Cにて2時間消化し、その後、TFA (4 μ l) を添加して、酵養反応を停止した。

得られた混合物を、逆相HPLC分析 (C-8カラム、Applied Biosystems) に供し、これを、2時間にわたって、0から100%のアセトニトリル (0.1% TFA中) の直線勾配で、流速0.2ml/分にて溶出し、280nmで検出した。個々のオリゴペプチドピークを含む画分を手動で回収し、そしてアミノ酸配列決定を直接受けさせた。4つのトリブリン処理フラグメントを、十分な量に分離して、アミノ酸配列決定を可能にした (配列番号37~40)。

臭化シアニン消化を、Sephacrose 12カラムから精製したレダクターゼ (実施例8) の150pmolの、70%硫酸中0.5M臭化シアニンとの、37°Cにて40時間のインキュベーションによって行い、続いて臭化シアニンおよび硫酸を、減圧下での遠心分離 (SpeedVac) によって除去した。得られたオリゴペプチドフラグメントを、HPLCによつて分離し、そして3つを、十分な量に分離して、配列決定を可能にした (配列番号41~43)。

実施例11

Forsythia intermediaからの

ピノレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのクロニング

植物材料。Forsythia intermedia植物は、Bailey's Nursery (var. Lynwood Gold, St., Paul, MN) から入手して、ワシントン州立大学温室施設において維持したが、または地域団体からの贈られたかのいずれかであった。

材料。使用した全ての溶媒および化学物質は、試薬級またはHPLC級であった。CO₂。でのUV RNAおよびDNA決定を、 λ 6 UV/VIS分光光度計で得た。Temptronic Iサーモサイクラー (ThermoLyne) を、全てのPCR増幅に使用した。Taq熱安定性DNAポリメラーゼを、Promegaから得、一方、制限酵素を、Gibco BRL (Gaithersburg, MD) から得、Boehringer Mannheim (Sau3a)、およびPromega (TaqI) から得た。pT781ueTベクターおよびコンピテントなNovaBlue細胞を、Novagenから購入し、そして放射線標識ヌクレオチド ([α -³²P]dCTPおよび[γ -³²P]ATP) を、DuPont NENから購

入した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II® キット (BIO 101 Inc.) を、PCRフラグメントの精製に使用し、ゲル精製DNA濃度を、1.5% アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定した。

Forsythia RNA単離。迅速に生長する緑色茎組織から機能性 *F. intermedia* RNAを単離する最初の試みは、不成功であった。これは、その植物フェノール性成分による容易な酸化を介して遭遇する困難に起因する。しかし、この問題は、RNA単離手順 (特に木本植物組織について設計され、これは、酸化を防ぐために、抽出緩衝液において低pHおよび還元条件を使用する) の利用によって、首尾よく克服された (Dong, Z.D., および Dunstan, D.I., Plant Cell Reports 15:516-521(1996))。

Forsythia intermedia cDNAライブラリー合成。全RNA (約300 μ g/新鮮重量) を、温室で生長させた *Forsythia intermedia* 植物 (var. Lynwood Gold) の若い緑色の茎から得た (Dong, Z.D., および Dunstan, D.I., Plant Cell Reports 15:516-521(1996))。

5:516-521(1996))。 *Forsythia intermedia* cDNAライブラリーを、5 μ gの精製

ポリA+ mRNA (Oligotex-dTM Suspension, QIAGEN) を用いて、ZAP-cDNA®合成

キット、Uni-ZAP[®]XRベクター、およびGigapack[®]II Gold packaging extract (S

tratagene) とともに構築し、 1.2×10^9 PFUの力価を有する一次ライブラリーを得

た。増幅したライブラリー (1.2×10^9 PFU/ml; 全158ml) の一部 (30ml) を使用

して、PCRのための純粋なcDNAライブラリーDNAを得た (Sambrook, J. & Molec

ular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Labo

ratory, Cold Spring Harbor, NY(1994); Ausubel, F.M. & Current Protocols i

n Molecular Biology, 第2巻, Greene Publishing Associates and Wiley-Inter

science, John Wiley & Sons, NY(1991))。

ビノシノール/ラリシノールレダクターゼDNAプローブ合成-N末端およ

び内部ペプチドアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを

構築した。詳細には、プライマー-PLRN5 (配列番号44) は、N-末端ペプチド (配列番号36) のアミノ酸7~13の配列に基づいた。プライマー-PLRL4R (配列番号45) は、(配列番号37) に示される内部ペプチド配列のアミノ酸2~8の配列に基づいた。プライマー-PLRL5R (配列番号46) は、(配列番号37) に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列に基づいた。配列番号37に示される内部ペプチド配列のアミノ酸9~15の配列 (プライマー-PLRL5R (配列番号46) の配列がこれに基づく) はまた、配列番号41に示される臭化シアン作製内部フラグメントのアミノ酸4~10の配列に対応した。

精製 *F. intermedia* cDNAライブラリー-DNA (5 ng) を、100 μ l PCR反応物 (10mM Tris-HCl (pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5mM MgCl₂, 各0.2mM/d NTP, および2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) におけるテンプレートとして、プライマー-PLRN5 (配列番号44) (100pmol) と、ならびにプライマー-PLRL5R (配列番号46) (20pmol) またはプライマー-PLRL4R (配列番号45) (20pmol) のいずれかとともに使用した。PCR増幅を、サーモサイクラーにおいて、以下のように行った: 94℃にて1分、50℃にて2分、および72℃にて3分の35サイクル; 72℃にて5分、そして最終サイクル後、4℃にて無期限に維持した。シングルプライマー、テンプレートのみ、およびプライマーのみの反応を、コントロールとして

行った。PCR産物を、1.5% アガロースゲルで分離した。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL4R (配列番号45) の組合せは、380bpの単一のバンドを生じた。これは配列番号47の塩基22~393に対応する。プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL5R (配列番号46) の組合せは、400bpの単一のバンドを生じた。これは配列番号47の塩基22~423に対応する。

2つの増幅したバンドのヌクレオチド配列を決定するために、5つの100 μ l PCR反応を、以下のテンプレートとプライマーの各々の組合せで、上記のように行った: 380bp増幅産物+プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL4R (配列番号45); 400bp増幅産物+プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRL5R (配列番号46)。プライマーおよびテンプレートの各組合せからの5

つの反応物を濃縮し (Microcon 30, Amicon Inc.)、そしてTE緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA; 2×200 μ l) で洗浄し、PCR産物を、TE緩衝液 (2×50 μ l) に凝いて回収した。これらを、分取用1.5%アガロースゲルで分離した。次いで、各ゲル精製PCR産物 (約0.2pmol) を、pT78lueTベクターに連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNova8lue細胞に形質転換した。インサートサイズを、急速煮沸溶解およびPCR技術を用いて決定した (R20マー (配列番号74) およびU19マー (配列番号75) プライマーを、製造業者 (Novagen) の説明書にしたがって利用する)。

制限分析を行い、プライマーおよびデンブプレートの各組合せに対して全てのインサートが同じであるかどうか決定した。制限分析を以下のように行った: 各インサートを、R20 (配列番号74) およびU19 (配列番号75) プライマーを利用して、PCRによって増幅した。100 μ l PCR反応物の各20 μ lに、4ユニットのHaeIII、1.5ユニットのSmaI、または5ユニットのTaqI制限酵素を添加した。制限消化を、HaeIIIおよびSmaIについては37℃にて、およびTaqI反応については65℃にて60分間進行させた。制限産物を、1.5%アガロースゲルで分離し、試験した全てのインサートについて1つの制限グルーブを生じた。

得られる組換えプラスミドのうちの5つを、DNA配列決定のために選択した。3つの組換えプラスミド (pT7PLR1~pT7PLR3と呼ばれる) からのインサートを、基質としての400bp PCR産物とともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプ

ライマー-PLRI5R (配列番号46) の組合せによって作製した。残りの2つの組換えプラスミド (pT7PLR4およびpT7PLR5と呼ばれる) からのインサートを、基質としての380bp PCR産物とともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRI4R (配列番号45) の組合せから作製した。5つ全ての配列決定したPCR産物は、同じオーブンリーディングフレームを含んだ。

(+)-デノリシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼプローブを、以下のようにつづらした: 5つの100 μ l PCR反応を、10ngのpT7PLR3 DNAとともに、プライマー-PLRN5 (配列番号44) およびプライマー-PLRI5R (配列番号46) とともに、上記のように行った。ゲル精製pT7PLR3 cDNAインサート (50ng) を、Pharmacia

のT7QuickPrime®キットおよび[α -³²P]dCTPとともに、キット説明書に従って使用して、放射性標識プローブを産生した (0.1ml中)。これを、BioSpin 6カラム (Bio-Rad) を通して精製し、そしてキャリアDNA (Sigma) から得た0.5mg/ml剪断サケ精子DNAの0.9ml) に添加した。

ライブラリースクリーニング。600,000PFUのF-Intemedia増幅cDNAライブラリーを、Stratageneの説明書にしたがって、一次スクリーニングのためにプレートした。ブラークを、Magna Nylon膜サークル (Micron Separations Inc.) にプロットし、次いでこれを風乾した。膜を、Whatman®3MM Chr紙の2層の間においた。cDNAライブラリー-ファージDNAを膜に固定し、そして100℃にて2分間のオートクレーブによって、迅速な消耗で1工程において変性した。膜を、6×標準クエン酸生理食塩水 (SSC) および0.1% SDSにおいて37℃にて30分間洗浄し、そして結晶化皿 (190×75mm) において、予熱した6×SSC、0.5% SDS、および5×Denhar d塩液 (ハイブリダイゼーション溶液、300ml) において57~58℃にて5時間穏やかに振盪しながらハイブリダイズした。

[³²P]放射性標識プローブを変性し (煮沸、10分)、素早く冷却し (氷、15分)、そして結晶化皿 (150×75mm) 中の予熱した新鮮なハイブリダイゼーション溶液 (60ml, 58℃) に添加した。次に、プレハイブリダイズした膜を、この皿に添加し、次いでこれを、プラスチックラックで覆った。ハイブリダイゼーションを、穏やかに振盪しながら57~58℃にて18時間行なった。膜を4×SSCおよび0.5% SDSにおいて室温にて5分間洗浄し、2×SSCおよび0.5% SDS (室温) に移し、

そして穏やかに振盪しながら57~58℃にて20分間インキュベートし、乾燥を防ぐためにプラスチックラックで覆い、そして最後に、増感スクリーンとともに、-80℃にて24時間Kodak X-DNAT ARフィルムに曝露した。

このスクリーニング手順は、350を超えるポジティブなブラークを生じ、20 (異なるシグナル強度) を、さらなる2回のスクリーニングに供した。最終精製の後、20のcDNAのうち6つを、インジボ切り出しによってpBluescriptにサブクローニングした。これらの6つのcDNAを、pTr-F11~pTr-F16と呼んだ (配列番号47、49、51、53、55、57)。

p1r-F11-p1r-F16ファージミドのインビボ切り出しおよび配列決定。6つの精製cDNAクローンを、Stratageneのインビボ切り出しプロトコルにしたがって、ファージからレスキューした。(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼをコードする6つの異なるcDNA (p1r-F11-p1r-F16) の両鎖を、重複配列決定プライマーを用いて、完全に配列決定した。

配列決定のためのDNAの精製は、QIAw11 Plusプラスミド精製システム (QIAGEN) を使用して、続いてPEG沈殿 (Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) を行い、DNA配列は、Applied Biosystems Model 373A自動シーケンサーを用いて決定した。DNAおよびアミノ酸の配列分析を、UnixベースのCGC Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8.19, 94年9月, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, Rice, P., Program Manual for the ECG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England (1996)) およびEXPASY World Wide Web分子生物学サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

全ての6つのcDNAは、同じコード領域であるが、異なる5'非翻訳領域を有した。一方、6つのcDNAの各々の3'非翻訳領域の分析は、全てが、最長cDNAの3'領域の短縮化バージョンであることを確認した。温室で生育させた植物の茎頂からの全RNAでの事前のRNAゲルプロット分析は、約1.2kbの長さの単一の転写物を確認した。

RNAゲルプロット分析。RNAゲルプロット分析のために、F. intermedia茎頂からの全RNA (1レーンあたり30μg) を、サイズによって、変性アガロースゲル電気泳動によって分離した。RNAを、荷電したナイロン膜 (GeneScreen Plus®, Dupont NEN) に移し、膜 (StratageneからのStratalinker) に架橋し、ブレイハイブリダイズし、cDNAクローニングの間にcDNAライブラリーをスクリーニングするのに使用した同じプローブとハイブリダイズし、そして水性ハイブリダイゼーション条件についての製造業者の説明書に従って洗浄した。次いで、膜を、増感スクリ

ーンとともに、-80℃にて48時間Kodak X-OMATフィルムに曝露した。

実施例12

(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼcDNA p1r-F11の

E. coliにおける発現

*Escherichia coli*における発現。推定(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼcDNAにコードされる機能的(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼを確認するために、おそらく(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼをコードするcDNAを、*E. coli*において異種発現した。異種発現はまた、将来、(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼの正確な生化学機構の系統的な研究を可能にするための十分なタンパク質を得るために、必要であった。

6つの推定(+)β-ピノレシノール/(+)β-ラリシレシノール-レダクターゼクローンの実験は、1つ (p1r-F11 (配列番号47)) が、pBluescriptにおけるβガラクトシダーゼのα相補性粒子とインフレーションにあることを明らかにした。これは、思いつけないことであった。なぜなら、容易な手段を潜在的に提供して、完全に機能的な融合タンパク質を発現し、従ってクロニン化配列が正しいことの証拠を提供するからである。

p1r-F11 (配列番号47) からの精製プラスミドDNAを、Novagenの説明書にしたがって、NovaBlue細胞に形質転換した。形質転換細胞 (5 ml培養物) を、37℃にて振盪しながら (225rpm)、中期対数期 ($OD_{600} = 0.5$) まで、 $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ テトラサイクリンおよび $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ アンピシリンを補充したLB培地 (Sambrook, J., M

oi

olecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) 中で増殖させた。次いで、IPTG (インゾプロビルβ-D-チオオグルコピラノシド) を最終濃度100mMまで添加して、そして細胞を2時間増殖させた。細胞を遠心分離によって回収し、そして $500 \mu\text{l}$ (5 ml培養管あたり) 緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH8.0, 5 mMジチオスレイトール) に再懸濁した。次に、リンチーム ($5 \mu\text{l}$ の 0.1mg ml^{-1} , Research Organics, Inc

.) を添加し、そして続いて10分間インキュベーションし、細胞を超音波処理によって溶解した (3 × 15秒)。14,000×gで4℃にて10分間の遠心分離の後、上清を取り出し、そして(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼ活性について、実施例8に記載のようにアッセイした (1アッセイあたり210 μ l 上清)。

触媒活性を、無細胞抽出物を、30℃にて2時間、(±)-ビノレシノール (0.4mM) および[4R-³H]NADPH (0.8mM) とともに、標準的な条件下でインキュベートすることによって確認した。インキュベーションに続いて、未標識(±)-ラリシレシノールおよび(±)-セコイソラリシレシノールを、放射化学キャリアとして添加し、各リダナンを逆相HPLCによって単離した。コントロールは、ビノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼcDNAのアッセイを含む。これは、フレーム外のcDNAインサート (全てのアッセイ成分を含む) ならびにpIrr-F11 (配列番号47) およびフレーム外のビノレシノール/ラリシレシノールレダクタゼcDNAを、[4R-³H]NADPH以外の基質を伴わずに含む。産物の分離およびキララル同定を、以前に記載される (Chu, A., ら, J. Biol. Chem. 268:27026-27033(1993)) ように、HPLCによって行った。

続くキララルHPLC分析は、(+)-ラリシレシノールおよび(-)-セコイソラリシレシノールの両方 (しかし、対応する対掌体ではない) が、放射性標識されていることを明らかにした (総活性: 54nmol hr⁻¹ mg⁻¹)。対照的に、(±)-ビノレシノールの非存在下、またはcDNAインサートがβガラクトシダーゼ遺伝子とインフレームに存在しないプラスミドを含むコントロール細胞を使用した場合には、いずれも触媒活性は検出されなかった。従って、異種発現された(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼおよび植物タンパク質は、正確に同じ鏡像時

異的 (enantioprecisely) 様式で機能する。

実施例13

(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼをコードするクローンpIrr-F11 (配列番号47) のcDNAインサートの配列および相同性分析配列分析。クローニング(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼ

ゼpIrr-F11 (配列番号47) の全長配列は、消化フラグメントのエドマン分解によって決定したペプチド配列のすべてを含んだ。

単一のORFにより、34.9kDaの計算分子量を有する312アミノ酸のポリペプチド (配列番号48) が推測され、これは、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼの2つのアイソフォームについてSDS-PAGEによって以前に推定した値 (約35kDaまたは約36kDa) にほぼ一致する。等しい数の酸性および塩基性残基もまた存在し、等電点クロマトグラフィーによって実験的に得られた等電点 (pI約5.7) とは対照的に、7.09の理論的等電点 (pI) を有する。

アミノ酸組成は、7つのメチオニン残基を明らかにする。興味深いことに、植物から精製した酵素のN-末端は、最初のメチオニンを欠如する。これは、公知の最も一般的な翻訳後タンパク質修飾である。結果として、cDNAにおける最初のメチオニンは、翻訳開始の部位であると考えられ得る。配列分析はまた、残基215での可能なNGリコシル化部位 (分泌標的化シグナルは存在しないが)、ならびに残基50および228 (プロテインキナーゼC型)、残基228、250、302、および303 (カゼインキナーゼII型)、ならびに残基301 (チロシンキナーゼ型) での7つの可能なタンパク質リン酸化部位を明らかにする。

ビノレシノール/ラリシレシノールポリペプチド領域 (配列番号48) もまた、NADPH結合と関連する保存配列を含むと同定された (Järnvall, H., Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes (Jeffery, J. 編) 126-148頁, Birkhäuser Verlag, Basel (1980) ; Branden, C., およびTooze, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991) ; Wierenga, R.K. ら, J. Mol. Biol. 187:101-108 (1986))。異なるレダクタゼの配列において、限られた数の不変アミノ酸が存在し、これらは、NADPH結合部位の指標として観察される。これらは、配列G-X-G-X-X-G (配列番号76) (ここでXは任意の残基) を有する3つの保存されたグリシン残基、および6つの保存された疎水性残基を含む。グリシンリッチ領域は、その正確なコンフォメーションにNADPHを配置することにおける中心的役割を果たすと考えられる。これに関して、(+)-ビノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタゼのN-末端

領域と、*Drosophila melanogaster* アルコールデヒドロゲナーゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)), *Pinus taeda* 桂皮アルコールデヒドロゲナーゼ (MacKay J.J. ら, Mol. Gen. Genet. 247:537-545 (1995)), ドッグフィッシュ (dogfish) 筋乳酸デヒドロゲナーゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)), およびヒト赤血球グルタチオンレダクターゼ (Branden, C., および Toozee, J., Introduction to Protein Structure, 141-159頁, Garland Publishing, Inc., New York and London (1991)) の保存された NADPH 結合領域の N 末端領域との比較は、いくつかの興味深い相似物を明らかにした。不変グリシン残基は、ドメインの形成における正確なパッケージングに必要な6つの疎水性残基のうちの4つであるように、全ての場合にアラニンメントされる。従って、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼアインフォームの NADPH 結合部位は、N 末端に近接して局在する。

相同性分析: インフラボニンレダクターゼに対する比較。BLAST 検索 (Altschul, S.F. ら, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) を、National Center for Biotechnology Information での非重複性ペプチドデータベースに対して、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼの翻訳されたアミノ酸配列 (配列番号 48) で行った。有意な相同性は、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼについて、マメ科植物 *Cicer arietinum* (Tienann, K., ら, Eur. J. Biochem. 200:751-757 (1991)) (63.5% 類似性, 44.4% 同一性)、*Medicago sativa* (Paiva, N.L. ら, Plant Mol. Biol. 17:653-667 (1991)) (62.6% 類似性, 42.0% 同一性)、および *Pisum sativum* (Paiva, N.L., ら, Arch. Biochem. Biophys. 312:501-510 (1994)) (61.6% 類似性, 41.3% 同一性) からの種々のインフラ

ボニンレダクターゼと示された。この観察は、かなり興味深いものである。なぜなら、インフラボニドは、フェニルプロパノイド-アセチル経路代謝の関連分岐を介して形成されるからである。詳細には、インフラボニンレダクターゼは、イ

ンフラボニド形成の間、 α, β -不飽和ケトンの還元を触媒する。例えば、*Medicago sativa* L.-インフラボニンレダクターゼは、フィトアレキシン ((-)-メディカルピン (medicarpin)) の生成において、2'-ヒドロキシ-ホルモノネチン (2'-hydroxy-fornonene) の (3R)-ベスチトン ((3R)-vestitone) への立体特異的変換を触媒する (Paiva, N.L. ら, Plant Mol. Biol. 17:653-667 (1991))。この配列類似性は、リグナンおよびインフラボニドの両方が、同程度の植物防御機能および薬理学的役割 (例えば、「植物性発情ホルモン様物質」とともに、一般的なフェニルプロパノイド代謝の派生物であることが、有意に与えられ得る。結果として、両レダクターゼは、非常に類似の反応を触媒するので、インフラボニンレダクターゼは、(+)-ピノレシノール/(+)-トリシレシノールレダクターゼから進化したかもしれないと推測する気にさせる。これは、リグナンが、シダ植物、マツモ、裸子植物、および被子植物に存在するので、ありそうなことと考えられる; それゆえ、それらの経路は、明らかにインフラボニドの前に進化した (Gang, ら, Phytochemicals for Pest Control, Hedinger, ACS Symposium Series, Washington D.C., 658:58-59 (1997))。

同程度の相同性もまた、*Arabidopsis thaliana* (Babiychuk, E. ら, EMBL/GenBank/DDBJ データベース (1995) への直接提出 (1995年5月25日)) (65.9% 類似性, 50.8% 同一性)、*Nicotiana tabacum* (Hibi, N. ら, Plant Cell 6:723-735 (1994)) (64.6% 類似性, 47.2% 同一性)、*Solanum tuberosum* (van Eldik, G.J. ら, (1995) EMBL/GenBank/DDBJ データベースへの直接提出 (1995年10月06日)) (65.5% 類似性, 47.7% 同一性)、*Zea mays* (Petrucchio, S. ら, Plant Cell 8:69-80 (1996)) (61.6% 類似性, 44.9% 同一性)、および特に *Lupinus albus* (Attucci, S. ら, 私信および EMBL/GenBank/DDBJ データベース (1996) への直接提出 (06/6/96)) (85.9% 類似性, 66.2% 同一性) からの推定インフラボニンレダクターゼ「ホモログ」で観察された。

対照的に、他の NADPH 依存性レダクターゼとの相同性は、有意に低かった: 例

えば、*Petunia hybrida* (Beid, M. ら, Plant Mol. Biol. 13:491-502 (1989)) (43.2% 類似性, 21.5% 同一性) および *Hordeum vulgare* (Kristiansen, K.N. および Ro

hde.W., Mol.Gen.Genet.230:49-59(1991) (46.2%類似性、21.1%同一性) からのジヒドロフラボノールレダクタターゼ、Medicago sativa(Ballance,G.M.およびDixon,R.A.,Plant Physiol. 107:1027-1028(1995) (39.5%類似性、15.8%同一性) からのカルコンレダクタターゼ、Sesbania rostrata(Coormachtig,S.ら、(1995)) BHL/GenBank/DDBJデータベースへの直接提出 (1995年3月13日)) (47.6%類似性、24.1%同一性) からのカルコンレダクタターゼ「ホモログ」、Nocardia sp. (Horinouchi,S.ら、Appl.Environ.Microbiol. 57:1386-1393(1991)) (46.6%類似性、21.0%同一性) からのコレステロールデヒドロゲナーゼ、ならびにRattus norvegicus(Zhao,H.-F.ら、Journal Endocrinology 127:3237-3239(1990) (43.5%類似性、20.6%同一性) からの3- β -H-ドロキシ-5-エンステロイドデヒドロゲナーゼ。

従って、配列分析は、(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクタターゼ、イソフラボンレダクタターゼ、および推定イソフラボンレダクタターゼ「ホモログ」(これは、イソフラボンレダクタターゼ活性を有さない) の間の有意な相同性を確証する。

実施例14

Thuja plicata(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクタターゼの

cDNAクローニング

植物材料。西洋赤杉植物 (Thuja plicata) を、ワシントン州立大学温室施設において維持した。

材料。使用したすべての溶媒および化学物質は、試薬またはHPLCグレードであった。Taq熱安定性DNAポリメラーゼおよび制限酵素 (SacIおよびXbaI) を、Promegaから入手した。p78BlueTベクターおよびコンピテントなNovaBlue細胞をNovagenから購入し、そして放射性標識化ヌクレオチド [α - 32 P]dCTP) をDuPont NEから購入した。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および配列決定のためのオリゴヌクレオチドプ

ライマーを、Gibco BRL Life Technologiesによって合成した。GENECLEAN II[®]キット (BIO 101 Inc.) を、PCRフラグメントの精製のために使用し、ゲル精製し

たDNAの濃度は、1.3%アガロースゲルにおける低DNA質量ラダー (Gibco BRL) と比較することによって決定した。

機器。UV (CO₂)₈₀₀でのRNAおよびDNA決定を含む) スペクトルを、 λ 6 UV/VIS分光光度計にて記録した。Temptronic IIサーモサイクラー (ThermoLyne) を、すべてのPCR増幅のために使用した。配列決定のためのプラスミドDNAの精製は、QIAwell Plusプラスミド精製システム (Qiagen) を使用し、続いてPEG沈殿 (Sambrook,J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) またはWizard@Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を行い、DNA配列は、Applied Biosystems Model 373A自動シーケンサを用いて決定した。

Thuja plicata cDNAライブラリー合成-全RNA(6.7 μ g/9新鮮重量)を、Lewinsonらの方法に従って、温室生長西洋赤杉植物 (Thuja plicata) の若緑葉 (葉柄 (stem)を含む) から得た (Lewinson,E.ら、Plant Mol.Biol.Rep. 12:20-25(1994))。T.plicata cDNAライブラリーを、3 μ gの精製ポリ(A)-mRNA(Oligotex[®]-dT¹⁸Suspension, Qiagen) を用いて、ZAP-cDNA[®]合成キット、Uni-ZAP[®]XRベクター、およびGigaPack[®]II Goldパッケージング抽出物 (Stratagene) とともに構築し、一次ライブラリーとして 1.2×10^8 pfuの力価を得た。増幅したライブラリー (7.1 $\times 10^8$ pfu/ml、全量28ml) を、スクリーニングのために使用した (Sambrook,J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994))。

T.plicata(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクタターゼcDNA合成。T.plicata(-)-ピノレシノール/(-)-ラリシレシノールレダクタターゼcDNAを、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) ストラテジーによってmRNAから得た (Sambrook,J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3巻、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994))。第1鎖cDNAを、T.plicata cDNAライブラリーの合成のために以前に使用した精製mRNA(上記) から

合成した。精製mRNA (150ng) を、ZAP-cDNA[®]合成キット (Stratagene) からのリ

ンカープライマー (1.4 μ g) と混合し、10分間70℃に加熱し、そして氷上で素早く冷却した。次いで、変性mRNAテンプレートおよびリソカープライマーの混合物を、First Strand Buffer (Life Technologies)、10mM DTT、0.5mM各dNTP、および200ユニットのSuper ScriptTM II (Life Technologies) と混合し、20 μ lの最終容量にした。反応を、42℃にて50分間行い、次いで加熱 (70℃、15分) によって停止した。E.coli RNaseH (1.5ユニット、1 μ l) を溶液に添加し、37℃にて20分間インキュベートした。

次に、第1鎖反応 (2 μ l) を、100 μ l PCR反応 (10mM Tris-HCl (pH9.0)、5mM KCl、0.1% TritonX-100、1.5mM MgCl₂、0.2mM各dNTP、および5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ) におけるテンプレートとして、プライマーCR6-NT (5'-GCA CATAACAGATCGATAAC3') (配列番号60) およびプライマーXhoI-Poly (d T) (5'-GTCTCGACAGTTTTTTTTTTTTT3') (配列番号59) (10pmol) とともに使用した。PCR増幅を、52℃でのアニリング温度を除いて、(Dinkova-Kostova, A.T.ら、J.Biol.Chem. 271:29473-29482(1996)) に記載のようにサーモサイクラーで行った。PCR産物を、1.3%アガロースゲルに溶解し、ここで、予測定 (約1,200bp) を有する少なくとも2つのバンドが観察された。バンドをゲルから抽出した。次いで、ゲル精製したPCR産物 (56ng) を、pT7BlueTベクター (50ng) に連結し、そしてNovagenの説明書に従ってコンピテントなNovaBlue細胞に形質転換した。

挿入したcDNAのサイズおよび方向を、急速煮沸溶解およびPCR技術を用いて、製造業者 (Novagen) の説明書に従って、以下のプライマーの組み合わせで決定した：R20マー (配列番号74) とU19マー (配列番号75)；R20マー (配列番号74) とCR6-NT (配列番号60)；U19マー (配列番号75) とCR6-NT (配列番号60)。挿入したDNAのCR6-NTプライマー末端を、TベクターのU19マープライマー部位の隣に配置した。挿入したcDNAを含むTベクターを、Wizard[®] Plus SV Miniprep s DNA Purification Systemで精製した。5つの挿入cDNAを、重複配列決定プライマーを用いて完全に配列決定し、そしてポリアダニル化部位が異なることを除いて同一であることを示した。それゆえ、最長のcDNA (p1r-Tp1と命名した) (配列番号61) を、pBluescript発現系を用いて、酵素活性の検出のために使用し

た。

配列分析-DNAおよびアミノ酸配列分析を、UnixベースのGCG Wisconsin Package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, 1994年9月、Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711(1996)；Rice, P. Program Manual for the GCG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1Rq, England) およびthe ExpasyWorld Wide Web molecular biology server (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) を用いて行った。

実施例15

Thujia plicata(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼの

cDNAクローニングおよび発現

T.plicata(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼのcDNAクローニング。p1r-Tp1をクローン化し、そして配列決定した後、全長クローンを使用して、p1r-Tp1全cDNAインサートをプロンプトとして使用したことを除いて、実施例11に記載のように、T.plicata cDNAライブラリーをスクリーニングした。いくつかのポジティブクローンを配列決定し、1つは新規の唯一のcDNAであることが明らかになり、これをp1r-Tp2と命名した。このcDNAは、p1r-Tp1に対する高度な配列類似性 (アミノ酸レベルで約81%類似性) を有するが、以下に記載のように、本来のForsythia intermediaレダクターゼに同一の基質特異性を有するレダクターゼをコードする。

酵素アッセイ。ピノレシノールおよびラリシレシノールレダクターゼ活性を、実施例8に記載のように、以下の改変とともに、[³H]ラリシレシノールおよび[³H]セコイソラリシレシノールの形成をモニターすることによってアッセイした。簡単に、ピノレシノールレダクターゼ活性についての各アッセイは、(±)-ピノレシノール (MeOH中 5mM, 20 μ l) および酵素調製物 (すなわち、E.coliからの全タンパク質抽出物、210 μ l) からなった。酵素反応を、[4R-³H]NADPH (10mM, 蒸留H₂O中 6.79kBq/nmol, 20 μ l) の添加によって開始した。振盪しながら30℃にて3時間のインキュベーションの後、アッセイ混合物を、放射性化学キャリアと

して(±)-ラリシレシノール (20 μ g) および(±)-セコイソラリシレシノール

(20 μ g) を含むEtOAc (500 μ l) で抽出した。遠心分離後 (13,800 \times g, 5分)、EtOAc可溶物を取り出し、そして抽出手順を反復した。各アッセイについて、EtOAc可溶物を、液体シンチレーションカウンタを用いるその放射活性の決定のために、取り出したアリコート (100 μ l) と含わせた。含わせたEtOAc可溶物の残りを吸引して真空中で乾燥し、MeOH/H₂O(30:70, 100 μ l)に再構成し、そして逆相およびキラルカラムHPLCに供した。

ラリシレシノールレダクターゼ活性を、(+)-[³H]-セコイソラリシレシノールの形成をモニターすることによってアッセイした。これらのアッセイを、上記のように正確に、但し(±)-ラリシレシノール (MeOH中 5mM, 20 μ l) を基質として使用したことを除いて、放射性化学キャリアとして(±)-セコイソラリシレシノール (20 μ g) を添加して行った。

E.coliにおけるpIrr-Ip1の発現-pIrr-Ip1のオーブニングフレーム (OR F) がpBluescript SK(-)における β ガラクトシダーゼ遺伝子 α 相補性粒子とインフレームであるために、pIrr-Ip1を、SacIおよびXbaIでpIrr-Ip1ベクターから切り出し、ゲル精製し、次いでこれらと同じ酵素で消化した発現ベクターに連結した。このプラスミドpPCR-Ip1を、Novagenの説明書にしたがって、NovaBlue細胞に形質転換した。形質転換細胞 (5ml培養物) を、37 $^{\circ}$ Cにて、50 μ g ml⁻¹カルベニシリンを補充したLB培地 (Sambrook, J.ら, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第3巻, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1994)) 中で、振盪しながら (225rpm)、中期対数期 (A_{600} =0.5~0.7) まで増殖させた。次に、細胞を、遠心分離 (1000 \times g, 10分) によって回収し、そして10mM IPTG (イソプロピル β -D-チオグルコピラノシド) および50 μ g ml⁻¹カルベニシリンを補充した新鮮なLB培地に、吸光度0.6 (600nmにおける) まで再懸濁した。細胞 (一晩増殖させた) を遠心分離によって回収し、そして500~700 μ l (5ml培養管あたり) の緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EDTA, 5mM DTT) に再懸濁した。次に、細胞を超音波処理によって溶解し (5 \times 45秒)、そして遠心分離 (17500 \times g, 4分, 10分) の後、上清を取り出し、そして(-)-ピノレシ

ノール/(-)-ラリシレシノールレダクターゼ活性について、上記のようにアッセイした。コントロールは、インサートDNAを含まないか (ネガティブコントロール

ールとして) または立体特異的コントロールとしてpPLR-F11 (インフレームで真正のF.intemedial(+)-ピノレシノール/(+)-ラリシレシノールレダクターゼのcDNA) を含むpBluescript (SK(-))、ならびに(4R)-HNADPHを除く基質を含まないpPLR-Ip1のアッセイを含んだ。

結果は、(-)-ラリシレシノールおよび(+)-セコイソラリシレシノールの両方が放射性標識され、そして放射性活性の取り込みが(-)-セコイソラリシレシノールでは見いだされないことを示した。しかし、(-)-ラリシレシノールについて観察されたよりもずっと遅い速度ではあるが、(+)-ラリシレシノールへの放射性標識の蓄積もまた観察された。これらの結果は、pIrr-Ip1は、基質として(-)-ピノレシノールおよび(+)-ピノレシノールの両方を使用し得、前者は(-)-ラリシレシノールを介して(+)-セコイソラリシレシノールに完全に変換され、そして後者は、ずっとより遅くに(+)-ラリシレシノールに変換されるが、さらに(-)-セコイソラリシレシノールへは変換されない。

E.coliにおけるpIrr-Ip2の発現。pIrr-Ip2 cDNAは、pBluescript SK(-)における β -ガラクトシダーゼ遺伝子 α 相補性粒子とインフレームであることが見いだされた。上記のように、活性および基質特異性について上昇した場合、pIrr-Ip2は、少量の(-)-ラリシレシノールもまた検出されたことを除いて、本来のForsythia aintemedialレダクターゼ (Dinkova-Kostova, A.T., ら, J.Biol.Chem. 271:29473-29482(1996)) と同じ基質特異性および産物形成を有することが見いだされた。これは興味深い、なぜなら、pIrr-Ip2は、Forsythiaレダクターゼに対するよりも、pIrr-Ip1に対して、より高度な配列類似性を有するからである。

全ての上記の観察を、重水素標識化基質(±)-[9,9'-²H₂,O²H₂]ピノレシノールを用いて、対応するリグナンの単離とともに確認した；次いで、各々を、キラルクロマトグラフィーおよび有PLC質量分析に供して、これらの知見を確認した。

Thuja plicataおよびTsuga heterophyllaからの

さらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼのクロニング

2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、Thuja plicata若い茎のcDNAライブラリーから、実施例15に記載のように、pIr-Tp2のクロニングのために、クロン化した。2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、pIr-Tp3 (配列番号65) およびpIr-Tp4 (配列番号67) と命名した。

2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、Tsuga heterophylla若い茎のcDNAライブラリーから、実施例15に記載のように、pIr-Tp2のクロニングのために、クロン化した。Tsuga heterophyllaからの2つのさらなるポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼを、pIr-Tp3 (配列番号69) およびpIr-Tp4 (配列番号71) と命名した。

本発明の好ましい実施態様が、例示および記載されているが、種々の変更が、本発明の精神および範囲から逸脱せずに本明細書中においてなされ得ることは明らかである。

配列表

(i) 一般的情報:

(i) 出願人: レヴィス, ノーマン ジー
 デイビン, ローレンス ビー
 ディンコバー・コストバ, アルベナ ティー
 フジタ, マサユキ
 ガン, デイビット アール
 サルカネン, シモ

(ii) 発明の名称: 組換えポリレシノール/ラリシレシノールレダクターゼ, 組換えディリジエントタンパク質, および使用方法

(iii) 配列数: 76

(iv) 連絡住所:

(A) 名称: クリステンセン, オコノール, ジョンソン アンド
 カインドネス
 (B) 番地: ファブス アベニュー 1420, スイート 2800
 (C) 市: シアトル
 (D) 州: ワシントン
 (E) 国: アメリカ合衆国
 (F) 郵便番号: WA98101-2347

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピー ディスク
 (B) コンピューター: IBM PC 互換用
 (C) OS: PC-DOS/MS-DOS
 (D) ソフトウェア: バテントイン リリース #1.0, パージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号:
 (B) 出願日:
 (C) 分類:

(vii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: シェルトン, デニス ケイ
 (B) 登録番号: 26,997
 (C) 照会/記録番号: WSUR11351

(ix) 電話回線情報:

- (A) 電話 : 206 682 8100
 (B) テレファックス : 206 224 0779

(2) 配列番号 1 の情報 :

- (1) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 28 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 一本鎖
 (D) トポロジー : 関連なし
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセティカル : NO
 (iv) アンチセンス : NO
 (v) フラグメント型 : N-末端
 (vi) 起源 :

(A) 生物名 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質 N 末端配列

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

Lys Pro Arg Pro Xaa Arg Xaa Xaa Lys Lys Glu Leu Val Phe Tyr Phe Xaa
 1 5 15
 Asp Ile Leu Phe Lys Gly Xaa Asn Tyr Asn Xaa Ala
 20 25

(2) 配列番号 2 の情報 :

- (1) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 24 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 関連なし
 (D) トポロジー : 関連なし
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセティカル : NO
 (iv) アンチセンス : NO

(v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

Thr Ala Met Ala Val Pro Phe Asn Tyr Gly Asp Leu Val Val Phe Asp
 1 5 10 15
 Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn
 20

(2) 配列番号 3 の情報 :

(1) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 16 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 関連なし
 (D) トポロジー : 関連なし
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセティカル : NO
 (iv) アンチセンス : NO
 (v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

Tyr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Leu Xaa Lys
 1 5 10 15

(2) 配列番号 4 の情報 :

- (1) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 15 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 関連なし
 (D) トポロジー : 関連なし
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセティカル : NO
 (iv) アンチセンス : NO

(v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

Asp Ile Ser Val Ile Gly Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg
 1 5 10 15

(2) 配列番号 5 の情報 :

- (1) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 15 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 関連なし
 (D) トポロジー : 関連なし
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセティカル : NO
 (iv) アンチセンス : NO

(v) フラグメント型 : Forsythia intermedia 指揮タンパク質内部トリプシンフラグメント

ラグメント

(xi) 配列：配列番号5：

Gly Val Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Asn Tyr 13
1 10

(2) 配列番号6の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：10アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジー：関連なし

(ii) 配列の種類：ペプチド

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメント型：Forsythia intermedia 指弾タンパク質内部ドリブシフ

ラグメント

(xi) 配列：配列番号6：

Ala Gln Gly Met Tyr Phe Tyr Asp Gln Lys 10
1

(2) 配列番号7の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：5アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジー：関連なし

(ii) 配列の種類：ペプチド

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメント型：Forsythia intermedia 指弾タンパク質内部ドリブシフ

ラグメント

(xi) 配列：配列番号7：

Tyr Asn Ala Trp Leu 5
1

(2) 配列番号8の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSINT1」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号8：

AAGGATGTC TTTTATTTT Y

(2) 配列番号9の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSIRJ」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号9：

TATTATGAG GAGACGCAAT

(2) 配列番号10の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「PCRプライマー-PSIRJ」

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号10：

STARTINGRRT CRCTHAANAC

20

(2)配列番号1.1の情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:19塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:他の核酸

(A)記載:PCRプライマー-PS(7R)

(iii)ハイボセディカル:NO

(xi)配列:配列番号1.1:

CONTHAARAA RYCNCHNGT

19

(2)配列番号1.2の情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:901塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:cDNA

(iii)ハイボセディカル:NO

(iv)アンチセンス:NO

(vi)起源:

(A)生物名:Forsythia Intermediaクローンpsd-11

(ii)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号:CDS

(B)存在位置:26..583

(xi)配列:配列番号1.2:

ATTTCGGCAG GAGATTAAAC CAAAC ATG GTT TCT TCT AAA ACA CAA AAT GTA GCT
Met Val Ser Lys Thr Gln Ile Val Ala
1 5

52

CTT TTC TGC TTC CTC ACT TCC ACC TCT TCC GGC ACC TAC TAC GGC GGC
Leu Phe Leu Cys Phe Leu Thr Ser Thr Ser Ala Thr Tyr Gly Arg
10 15 20 25

100

ARG CCA CGC GCT CGC CGC TCC AAA GAA ATG GTG TTC TAT TTC CAC
Lys Pro Arg Pro Arg Pro Cys Lys Glu Leu Val Phe Tyr Phe Ile
30 35 40

148

GAC GTA CTT TTC AAA GGA AAT AAT TAC CAC AAT GGC ACT TCC GGC ATA
Asp Val Leu Phe Lys Gly Asn Asn Tyr His Asn Ala Thr Ser Ile
45 50 55

195

GTC GGG TCC CCC CAA TGG GGC AAC AAG ACT GGC ATG GGC GTG CCA TTC
Val Gly Ser Pro Gln Trp Gly Asn Lys Thr Ala Met Ala Val Pro Phe
60 65 70

244

AAT TAT GGT GAC CTA GTT GTC TTC GAC GAT CCC AIT ACC TTA GAC AAC
Asn Tyr Gly Asp Leu Val Val Phe Val Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn
75 80 85

232

AAT CTG CAT TCA CCC CCA GTG GGT GCG GGA GGG ATG TAC TTC TAT
Asn Leu His Ser Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Met Tyr Tyr
90 95 100 105

340

GAT CAA AAA AAT ACA TAC AAT GCT TCG CTA GGG TTC TCA TTT TTG TTC
Asp Gln Lys Asn Thr Tyr Asn Ala Trp 115 120

388

AAT TCA ACT AAG TAT GTT GGA ACC TTG AAC TTT GCT GGG GGT GAT CCA
Asn Ser Thr Thr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro
125 130 135

436

TTG TTG AAC AAG ACT AGA GAC ATA TCA GTC AAT GGT GGA ACT GGT GAC
Leu Leu Asn Lys Thr Arg Asp Ile Ser Val Ile Gly Thr Gly Asp
140 145 150

484

TTT TTC ATG GCG AGA GGG GTT GGC ACT TTG ATG ACC GAT GGC TTT GAA
Phe Phe Met Ala Arg Gly Val Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Glu
155 160 165

532

GGG GAT GTG TAT TTC CGC CTT GGT GTC GAT AAT AAT TTG TAT GAA TGT
Gly Asp Val Tyr Phe Asn Leu Arg Val Asp Ile Asn Leu Tyr Glu Cys
170 175 180 185

580

TGG TAAACAAATT AGCGTATAT ATATATATAT ATGCGTATAC ATATTTCTATA
TTP

633

GAAATCGAGT TTCTGTTC AAATCTGCT TCTTTAGTT GTGCGCCAA TAAABBAATG

693

TACAGCATAT TTAATTAATA TAATTTATTA ATGTGTTCAT TTTTGAGTT AAATTTAGT

753

TGTATTTATT TCAATTAATA TAATTTCTCT ATTAATTAATA TACTCBAAGT GACACATATT

813

CAGACACCA TATGTAACTT TATTTCTAT CTTCACCAAG TCTCAATATG TCAATATAT

873

TCTCTATTG AAAAAAATA AAAAAAATA

901

(2)配列番号1.3の情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:186アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(D)トポロジ:直鎖状

(ii)配列の種類:タンパク質:Forsythia Intermedia PSD-F11タンパク質

(xi)配列:配列番号1.3:

Met Val Ser Lys Thr Gln Ile Val Ala Leu Phe Leu Cys Phe Leu Thr
1 10
Ser Thr Ser Ser Ala Thr Tyr Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Arg Pro
20 25 30
Cys Lys Gln Leu Val Phe Tyr Phe His Asp Val Leu Phe Lys Gly Asn
35 40 45
Asn Tyr His Asn Ala Thr Ser Ala Ile Val Gly Ser Pro Gln Trp Gly
50 55 60
Asn Lys Thr Ala Met Ala Val Pro Phe Asn Tyr Gly Asp Leu Val Val
65 70 75 80
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val
85 90 95
Gly Arg Ala Gln Gly Met Tyr Phe Tyr Asp Gln Lys Asn Thr Tyr Asn
100 105 110
Ala Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr Lys Tyr Val Gly
115 120 125
Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Leu Asn Lys Thr Arg Asp
130 135 140
Ile Ser Val Ile Gly Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg Gly Val
145 150 155
Ala Thr Leu Met Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu
160 165 170 175
Arg Val Asp Ile Asn Leu Tyr Gln Cys Trp Asn Ser Thr Thr Thr Thr
180 185 190 195

(2) 配列番号 14 の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 888塩基対
- (B) 型: 核酸塩基配列
- (C) 数の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PSD-F12
- (iii) ハイボセディカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: CDS
 - (B) 存在位置: 19..573

(ii) 配列: 配列番号 14

ANTTGGCAC CAGGAAA ATG GCA GCT AAA ACA CAA ACC ACA GCC CTT TTC
Met Ala Ala Lys Thr Gln Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
190
CTC TGC CTC CTC ATC TGC ATC TGC GCG GTG TAC GGC CAC CAA ACC AGG
Leu Cys Leu Leu Ile Cys Ile Ser Ala Val Tyr Gly His Lys Thr Arg
200 205 210
TCT GGA GCG CCC TGT NAA GAG CTC GTT TTC TTC CAC GAC ATC CTC
Ser Arg Arg Pro Cys Lys Leu Val Phe Phe His Asp Ile Leu
215 220 225
TAC CTA GGA TAC NAT AGA AAC NAT GCG ACC GGT GTC ATA GTA GCC TCT
Tyr Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Thr 210 215 245
CCT CAA TGG GGA AAC AAG ACT GCG ATG GCT AAA CCT TTC NAT TTT GGT
Pro Gln Trp Gly Asn Lys Thr Ala Met Ala Lys Pro Phe Asn Phe Gly
250 255 260
GAT TTG GTT GTG TTT GAT GAT CCC ATT ACC TTA GAC AAC AAC CTG CAT
Asp Leu Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His
265 270 275
TCT CCT GCG GTC GCG GCG GCT CAG GGA ACT TAT TTC TAC GAT CAA TGG
Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Thr Tyr Phe Thr Asp Gln Trp
280 285 290 295
AGT ATT TAT GGT GCA TGG CTT GCA TTT TCA TTT TTG TTC AAT TCT ACT
Ser Ile Tyr Gly Ala Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr
300 305 310 315
GAT TAT GTT GGA ACT CTA AAT TTT GCT GGA GCT GAT CCA TTG ATT AAC
Asp Tyr Val Gly Thr Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Ile Asn
320 325 330
AAA ACT AGG CAC ATT TCA GTA ATT GGA GGA ACT GGT GAT TTT TTC ATG
Lys Thr Arg Asp Ile Ser Val Ile Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met
335 340 345
GCT AGA GCG GTA GCG ACT GTG TCG ACC GAT GCT TTT GAA GGG GAT GTT
Ala Arg Gly Val Ala Thr Val Ser Thr Asp Ala Phe Gln Gly Asp Val
350 355 360
TAT TTC AGG CTT CTT GAT ATT AGC TTG TAT GAG TGT TGG
Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asp Ile Arg Leu Tyr Gln Cys Trp
365 370 375
TAATTTACG TTATTTTCC ATTTCCTCA GTTTCACGCG CATTTCCTCA ATATGCTTT
633
CTGTAACCT TGTATTGAT CAATTGTGG CGATTTCAC ATATTGAT TATTGCTTC
693
ATATTTAAT CTGTAAATAA AATTTGTGT CAAAGCCAA TAACCAAC CTAAGGAGT
753
TTTTCGGT AAGGCCAAA AATAGTANGT CCAAGGTGA CTAGCTTTC AATTCAATC
813
AATTTGCT TTTCATCAT CTCTCTCAA AAAAAAAR AAAAA

(2) 配列番号 15 の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 185アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia 指標タンパク質PSD-F12

(xi) 配列: 配列番号15:

Met Ala Ala Lys Thr Gln Thr Thr Ala Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ile
1 5 10 15
Cys Ile Ser Ala Val Tyr Gly His Lys Thr Arg Ser Arg Arg Pro Cys
20 25 30
Lys Glu Leu Val Phe Phe His Asp Ile Leu Tyr Leu Gly Tyr Asn
35 40 45
Arg Asn Asn Ala Thr Ala Val Ile Val Ala Ser Pro Gln Trp Gly Asn
50 55 60
Lys Thr Ala Met Ala Lys Pro Phe Asn Phe Gly Asp Leu Val Val Phe
65 70 75 80
Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val Gly
85 90 95
Arg Ala Gln Gly Thr Tyr Phe Tyr Asp Gln Trp Ser Ile Tyr Gly Ala
100 105 110
Trp Leu Gly Phe Ser Phe Leu Phe Asn Ser Thr Asp Tyr Val Gly Thr
115 120 125
Leu Asn Phe Ala Gly Ala Asp Pro Leu Ile Asn Lys Thr Arg Asp Ile
130 135 140
Ser Val Ile Gly Gly Thr Gly Asp Phe Phe Met Ala Arg Gly Val Ala
145 150 155 160
Thr Val Ser Thr Asp Ala Phe Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg
165 170 175
Val Asp Ile Arg Leu Tyr Glu Cys Tyr
180 185

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 948塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 型の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質cDNA PSD-Th1

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(i) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 104..688

(xi) 配列: 配列番号16:

(ii) 配列の種類: Triticum aestivum 指標タンパク質TAA1

GCGCACCCCTC TCTCTCTAT TCGACCCCTC TCTCTCTACT TCTCTCTGTA GTTCTTGAT
60
CCCATATCTT CTCTATATAT CACTTACTGC TATAGNTTG TCA ATG GCA ATC AAG
115 Met Ala Ile Lys
AAT COT AAT AGA GCT GTG CAC TTG TGT TTT CTA TGG CTT CTA CTG TCC
163 Asn Arg Asn Arg Ala Val His Leu Cys Phe Leu Trp Leu Leu Ser
190 195 200 205
TCT GTG TTG TTA ACA ACA AGT GAT GGG AAA AGC TGG AAG AAG CAC CGA
211 Tyr Val Leu Leu Gln Thr Ser Asp Gly Lys Ser Trp Lys Lys Arg
215 220 225
CTC CCA AAG COT TGT AGG AAT CTG GTG TTG TAT TTC CAT GAT GAT GAT ATC
259 Leu Arg Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Val Ile
225 230 235
TAC AAT GCC AGC AAC GCC AAG AAC COT ACA TCC ACA CTT CTG GCT GCT
307 Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Lys Asn Ala Thr Ser Thr
240 245 250 255
CCC CAC GGG TCT ARC CTC ACA CTT CTC GCT GCA AAA GAC AAC CAC TTT
355 Pro His Gly Ser Asn Leu Thr Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe
260 265 270
GCA CAT CTG GCG CTG TTT CAC GAT CCG ATC ACT CTT GAC PAC AAT TTC
403 Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Phe
275 280 285
CAC TCT CTT CCG GTG GCG ACA GCT CAG GCA TTC TAC TTT TAT CAC ATC
451 His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gln Phe Tyr Phe Tyr Asp Met
290 295 300 305
PAG AAC ACC TTC AGC TCC TGG CTT GCA TTC AGC TTT GTA CTC AAC TCT
499 Lys Asn Thr Phe Ser Ser Trp Leu Leu 310 315 320
ACA GAT TAC AAA GCG ACC ATC AGC TTC TCT GCA GCG GAT CCA AAG CTT
547 Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Ser Gly Ala Asn Pro Ile Leu
325 330 335 340
ACT AAA TAC AGA GAT ATA TCA GTG GTG GCA GCA ACT GCA GAT TTC ATA
595 Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Ile
345 350
ATG GCA ACA GGA ATC GCG ACA ATC TCC ACC GAT GCG TAT GAA GGC CAC
613 Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp
355 360 365
GTT TAC TTC COT CTC TGC GTG AAT ATC ACA CTC TAT CAC TCC TAC
688 Val Tyr Phe Arg Leu Cys Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr
370 375 380
TGAAGCTAT AGTCTATTT TCTCTCTGCA CTATCTATTT ATATCTTCAI TTAGTGTAA
748 CTATCTTTT CTGTGCGAG AGATATGCA GAGCTCTGA GATATCTAG CGTGAATTC
808 CTTTACGAG CCAATATGT ATTTGATTT TGTGAGAGC CAATCTAT ATTTGCAAG
868 GAAATGAG ATTTCTATGT CGGTACGCA CTTTATTTA AAATATAG AAATTTGCT
928 TAAAAAAA AAAAAAAA
948

(2) 配列番号17の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 195アミノ酸
(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質PSD-Tb1

(11) 配列番号17:

Met Ala Ile Lys Asn Arg Asn Arg Ala Val His Leu Cys Phe Leu Trp 15

Leu Leu Leu Ser Ser Val Leu Leu Glu Thr Ser Asp Gly Lys Ser Trp 30

Lys Lys His Arg Leu Arg Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Phe 45

His Asp Val Ile Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Lys Asn Ala Thr Ser Thr 60

Leu Val Gly Ala Pro His Gly Ser Asn Leu Thr Leu Leu Ala Gly Lys 75

Asp Asn His Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu 90

Asp Asn Asn Phe His Ser Pro Val Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr 105

Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ser Trp Leu Gly Phe Thr Phe 120

Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Ser Gly Ala 135

Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr 150

Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala 165

Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Cys Val Asn Ile Thr Leu Tyr 180

Glu Cys Tyr 195

(2) 配列番号18の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 840塩基対
(B) 型: 核糖
(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: Tsuga heterophylla 指標タンパク質PSD-Th2 cDNA

(111) ハイボセティカル: NO

(112) アンチセンス: NO

(12) 配列の特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 71..625

(11) 配列: 配列番号18:

GTTCTGTTCC AATTCATAT TAGCTTCCA TTCAATCCAG GATCCCATC TTCTTCCTTC 60

AAGATTGCGA ATG GCT ATC AAG AGT AAT NAG GCT GTC GCT TTC TCC TTT 109

Met Ala Ile Lys Ser Asn Arg Ala Val Arg Phe Cys Phe 205

GTA TGG GTT CTG TTG TTC GAA AGT GGT TTT GTA TTT CCA CTC CCA CAG 157

Val Trp Leu Leu Leu Leu Glu Ser Gly Phe Val Phe Pro Leu Pro Glu 210

CCT TGT AGG AAT CTG GTT TTG TAT TTC CAC GAT GTA CTC TAC TAC GGC 205

Pro Cys Arg Asn Leu Val Val Leu Tyr Phe His Asp Val Leu Tyr Asn Gly 235

TTC AAC GCC CAC AAC GCT ACA TGT ACA GTT CTG GGT GCT CCA CAG GGG 253

Phe Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val Gly Ala Pro Glu Gly 255

GCT AAC CTC ACA GTT CTC GCT GCA AAA CAC AAC CAC TTT GGA GAT CTG 301

Ala Asn Leu Thr Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe Gly Asp Leu 270

GGC CTG TTC GAC GAT CCG ATC ACT GTC TAC TAT GAC ATG AAG AAC ACC 349

Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 285

CCG CTG GCC AGA GCT CAG GGA TTC TAC TTT TAT GAC ATG AAG AAC ACC 397

Pro Val Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Asp Met Lys Asn Thr 290

TTC ACC TCC TGG GTT GGA TTC AGG TTT GTA CTC AAC TCT ACA GAT TAC 445

Phe Ser Ser Trp Leu 310

AAA GGC ACC ATC AGG TTC TCT GGA GCC GAT CCA ATG CTT ACT AAA TAC 493

Lys Gly Thr Ile 325

AGA GAT ATA TCA GTG GTG GGA GGA ACT GGA GAT TTC ATA ATG GCA AGA 541

Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg 350

GGA ATC GCC ACA ATC TCC ACC GAT CCG TAT GAA GGA GAT GTT TAC TTC 589

Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe 365

GCT CTC GGC CTC BAT ATC ACA CTC TAT GAA TGC TAC TGTATATAT 635

Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 370

ARGAGCTAC TGTTCCTCT CTGCTCTCC CATTCTGATG CTCCTTTTAA CATTACTGCT 595
 TTCCATAAT TGTGTAGCC TCTCATPAA ACCAGTAA ATATTCTTC TGTATTTTA 755
 GCAGCTCCA AATCATGTA TTGATATTT ATATTATTG CATTATATAC AAGTCCATA 815
 AATATTCTT CAGCTAATAA AAAA 849

(B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジ：直鎖状
 (ii)配列の種類：Thula pilicala指揮タンパク質PSD-TpI CDNA
 (iii)ハイボセデンス：NO
 (iv)アンチセンス：NO
 (ix)配列の特徴：

(2)配列番号19の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：185アミノ酸
 (B)型：アミノ酸
 (D)トポロジ：直鎖状

(ii)配列の種類：PSD-Thから翻訳されたTsuga heterophylla指揮タンパク質

(xi)配列：配列番号19：

Met Ala Ile Lys Ser Asn Arg Ala Val Arg Phe Cys Phe Val Trp Leu 1
 5 10 15
 Leu Leu Leu Gln Ser Gly Phe Val Phe Pro Leu Pro Gln Pro Cys Arg 20
 25 30
 Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Val Leu Tyr Asn Gly Phe Asn Ala 35
 40 45
 His Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val Gly Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu 50
 55 60
 Thr Leu Leu Ala Gly Lys Asp Asn His Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe 65
 70 75 80
 Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Phe Gln Ser Pro Pro Val Gly 85
 90 95
 Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ser 100
 105 110
 Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr 115
 120 125
 Ile Thr Phe Ser Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Thr Tyr Arg Asp Ile 130
 135 140
 Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Ile Met Ala Arg Gly Ile Ala 145
 150 155 160
 Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg 165
 170 175
 Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180
 185

(2)配列番号20の情報：

(i)配列の特徴：

- (A)長さ：873塩基対

(ii)配列：配列番号20：

GTTCACACAG CGATTTCAG AGAT ATG AGT AGA ATA GCA TTT CAT TTG TGC 51
 Met Ser Arg Ile Ala Phe His Leu Cys 190
 TTC ARG GGG CTT CTG CTC TCT TCC ACG GTG CTC AGA AAT GTA CAT GGC 99
 Phe Met Gly Leu Leu Leu Ser Ser Thr Val Val Arg Asn Val Asp Gly 200
 205 210
 CAT GCA TGG AAG AGG CAA CTT CCA ATG CCA TGT AAG AAT TTG CTC CTC 147
 His Ala Trp Lys Arg Gln Leu Pro Met Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu 215
 220 225
 TAC TTT CAT CAT ATA CTC TAC AAT GGC AAA AAC ATT CAC AAT GCA ACT 193
 Tyr Phe His Asp Ile Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Ile His Asn Ala Thr 230
 235 240
 GCT GCG CTG GTT GCA CCT CTT GCG TGG GGC AAT CTC ACT ACT TTC GCT 243
 Ala Ala Leu Val Ala Ala Pro Ala Trp Gly Asn Leu Thr Thr Phe Ala 245
 250 255
 GAA CCT TTC AAG TTT GGA CAT GTG CTT GTG TTT GAC CAT GCG AAT ACT 291
 Gln Pro Phe Lys Phe Gly Asp Val Val Val Phe 260 265 270
 CTC GAC AAC AAT CTT CAC TCT CTT CTT GCG AGA GCG CAG GGA TTT 339
 Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe 275
 280 285 290
 TAT TTG TAC AAC ATG AAG ACT ACT TAC AAT GCT TGG TTG GGG TTC ACA 387
 Tyr Leu Tyr Asn 295 300 305
 TTT CTG CTG AAT TCG ACA CAT TAT AAG GCG ACA ATC ACC TTC AAT GGC 435
 Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly 310
 315 320 325
 GGC GAC CCC CCG CTC CTT BAC TAC AGA CAT ATA TCC GTT GTT GCG GGT 483
 Ala Asp Pro Pro Leu Val Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly 325 330 335
 ACG GGT CAT TTC ATG ACG GGA AAT GCT ACC CTT TCT ACT GAT 531
 Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Leu Ser Thr Asp 340
 345 350
 GCA ATC GAG GGA AAT CTT TAT TTC CCA CTC ACG CTT AAC ATC ACA CTC 579
 Ala Ile Glu Gly Asn 355 360 365 370

TAC GAG TGT TAC TGAATATAC TACATATAC GAGAGTCTTT GTTAGAGAA
Tyr Gln Cys Tyr

631

TAAGTGTG GGTCTTTAC TTAAGTACA GTTCTTACG ACTGAGTC TTGTTTAGA

691

TGAATGCAAT GTTGGCTTTT-CITTCCTGCT GAGGTATAC ATCACTCTCT ACCAGTCTTA

751

CTGAAATG TTAAGTATT GAGAGTCTT GTAGTTCG TATATGCTT TTGGCTGTT

811

TTTTCCTGCT CGAATATATA AAAAAAATA AAAAAAATA AAAAAAATA

871

AA

873

(2) 配列番号 21 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 189 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 21:

Met Ser Arg Ile Ala Phe His Leu Cys Phe Met Gly Leu Leu Leu Ser
1 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Ser Thr Val Leu Arg Asn Val Asp Gly His Ala Trp Lys Arg Gln Leu
20 25 30 35 40 45 50 55 60

Pro Met Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Leu Tyr
35 40 45 50 55 60

Asn Gly Lys Asn Ile His Asn Ala Thr Ala Ala Leu Val Ala Ala Pro
50 55 60

Ala Trp Gly Asn Leu Thr Thr Phe Ala Gln Pro Phe Lys Phe Gly Asn
65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150

Val Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser
85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150

Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Leu Tyr Asn Met Lys Thr
100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150

Thr Tyr Asn Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp
115 120 125 130 135 140 145 150

Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Pro Leu Val Lys
130 135 140 145 150

Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala
145 150 155 160

Arg Gly Ile Ala Thr Leu Ser Thr Asp Ala Ile Gln Gly Asn Val Tyr
165 170 175

Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Gln Cys Tyr
180 185

(2) 配列番号 22 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 867 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Thujia plicata 樹干タンパク質 PSD-1p2 cDNA

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を基に記号: CDS

(B) 存在位置: 80..655

(xi) 配列: 配列番号 22:

GCATATCT GTGTGTCAG TAACTATCT GTGTGACG TGTATGCTAT ACCCAACAT
60

TTCTCTCTCT TTTCGAAAT ATC GCA ATG GGT GCA AAA TTT CTG CAT TTC
112

ATC Ala Met Lys Ala Ala Lys Phe Leu His Phe
130 135 140 145 150

TTA TTT ATC TGG CTT CTA CTC TGC ACT GTG TTG CTG AAA TCT GCA GAC
160

Leu Phe Ile Trp Leu Leu Val Cys Thr Val Leu Leu Lys Ser
205 210 215

TGT CAT AGA TGG TAG TAG AAA ATT CCA GAG CCA TGT AAG AAT CTG GTA
208

Cys His Arg Trp Lys Lys Ile Pro Gln Pro Cys Lys Asn Leu Val
220 225 230 235

TTG TAC TTT CAT CAT ATC CTC TAC AAT GCA TCC AAC AAR CAC AAT GCA
256

Leu Tyr Phe His Asp Ile Leu Tyr Asn Gly Ser Asn Lys His Asn Ala
240 245 250 255

ACA TCT GCA ATT GTT GGA GCA CCC AAA GCA GCC AAT CTC ACT ATT TTG
304

Thr Ser Ala Ile Val Gly Ala Pro Lys Gly Ala Asn Leu Thr Ile Leu
260 265 270 275 280 285 290 295

ACT GGT AAC AAC CAT TTT GGA GAT GTG CTT GTG TTT GAT CAT CCT ATT
352

Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asp Val Val Phe Asp Asp Pro Ile
280 285 290 295 300 305 310 315

ACT CTT GAC AAC AAT CTT CAC TCT ACT CTT GTG GGA AGA GCT CAG GGC
400

Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Thr Pro Val Gly Arg Ala
290 295 300 305 310 315

TTT TAT TTC TAT GAT ATG AAG AAT ACA TTC AAT TCT TGG CTT GGG TTT
448

Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Asn Ser Trp Leu Gly Phe
305 310 315 320 325 330 335 340 345 350

ACA TTT GTG TTG AAT TCA ACA AAT TAT AAG GGC ACC ATC ACC TTC AAT 496
 Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asn Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn 325
 GGG GCT GAC CCA AAT CTG ACT AAG TAC AGA GAT ATA TCT GTT GTG GGT 544
 Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly 340
 GGT ACG GGT GAT TTC TTG ATG GCC AGA GGA ATC GCC ACC AAT TCT ACT 592
 Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr 345
 GAT GCA TAC GAG GGA GAT GTT TAT TTC CCG CTG AGG GTG AAT ATC ACT 640
 Asp Ala Tyr Glu Gly Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr 365
 CTC TAT GAG TGT TAC TGAATCGAAT TTGATTTCT GTTCTAATCT CTAAATTGAG 695
 Leu Tyr Glu Cys Tyr 380

AGCATGACCA TTTATTAAC TTATAGAG CAAATATPAA TAGTGCGAGG AATATAGAG 755
 GTAAGGATG AGATATTTTC AGCCTCAAT CTATATCTGC ATGCTTTTG TATGTCAT 815
 TGTATTAATA AATTGACCA GTTTCATAT GTTCAGAAA AAAAAAAAAA AA 867

(2) 配列番号 23 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 192 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 型の数: 直鎖状
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (E) 配列の種類: タンパク質

(ii) 配列: 配列番号 23:

Met Ala Met Lys Ala Ala Lys Phe Leu His Phe Leu Phe Ile Trp Leu 1
 5 10 15
 Leu Val Cys Thr Val Leu Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Arg Trp Lys 20
 25 30
 Lys Lys Ile Pro Glu Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35
 40 45
 Ile Leu Tyr Asn Gly Ser Asn Lys His Asn Ala Thr Ser Ala Ile Val 50
 55 60
 Gly Ala Pro Lys Gly Ala Asn Leu Thr Ile Leu Thr Gly Asn Asn His 65
 70 75
 Phe Gly Asp Val Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 80
 85 90 95
 Leu His Ser Thr Pro Val Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 100
 105 110
 Met Lys Asn Thr Phe Asn Ser Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 115
 120 125

Ser Thr Asn Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile 130
 135 140
 Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe 145
 150 155
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly 165
 170 175
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180
 185 190

(2) 配列番号 24 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 914塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 型の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (E) 配列の種類: Thnja plicatata指環タンパク質PSD-1p3 cDNA
- (F) ハイボセセンス: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (H) 配列の特徴:
- (I) 特徴を表す記号: CDS
- (J) 存在位置: 94..669

(ii) 配列: 配列番号 24:

CCTAGCAAT ATCTGAGG GAGCGGAAA TTGAGATAT TGTGTGCA AATATPAAA 60
 AGATAGCTT CAGGCAAT TCGAGATGT GTT GTA TCT AAA ACA GCT GCT AGA 114
 Val Ser Lys Thr Ala Ala Arg 119
 GTT CTG CAT TTA TCG TTT CTA TGG CTT CTA GTA TCT GCA ATC TTC ATA 162
 Val Leu His Leu Cys Phe Leu Trp Leu Val Ser Ala Ile Phe Ile 200
 205 210
 AAA TCT CCA GAT TCG CCG AGC TCG AAA AAC AAC GAT CTT CCA AAC CCG TCG 210
 Lys Ser Ala Asp Cys Arg Ser Trp Lys Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys 215
 220 225
 ACA AAT CTT TCG TTA TAT TTT CAG ATA ATC TAC AAT GGC AAA AAT 258
 Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn 245
 250 255
 GCA GAG AAT GCA ACA TCT GCA CTT GTT TCA GCG CTT CAA GGA GCT AAT 306
 Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Pro Glu Gly Ala Asn 250
 255 260

CTC ACC ATT ATC ACT GGT AAT AAC CAT TTT GGG AAT CTT GCA GTG TTT 354
 Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Leu Ala Val Phe 275
 265
 GAT GAT CTT ATT ACT CTT CAC CAC AAT CTT CAC TGT CCG CCG CTT GCA 402
 Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Val Gly 285
 280
 AGA GCT CAG GGC TTT TAC TTC TAT GAC AAG AAG AAC ACC TTC AGT GCC 450
 Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala 300
 305
 TGG CTT GGC TTC ACA TTT GTG CTC CAT TCA ACT GAT CAC AAG GGC TCC 498
 Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly Ser 315
 320
 AAT ACT TTC AAT GGA GCA GAT CCC ATC TTA ACA AAG TAC AAG GGC ATA 546
 Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile 330
 335
 TCT GTT GTG GGT GGA ACA GGG GAT TTC TTG ATG GCA AGA GGA ATT GCT 594
 Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala 345
 350
 ACC ATT TCT ACT GAC TCA TAT CAG GCA GAT GTT TAT TTC AGG CTT AGC 642
 Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg 360
 365
 GTC AAT ATC ACA CTC TAT GAC TGT TAC TCA CAAATT CTTCTCTG 689
 Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 380
 385
 TATTTCTGTT TTTTGGACC TTTTAAAGAT AGTGTGTTAC TTTCAAGTCT CTATAGTAA 749
 TACACTGTC TGAGATTAT ATACGATGCA CTATAGAAC TATGTTGAAT TCTGTTCTGT 789
 AGCTAATTA TGTATATGAT CACATCAAT CTCTTAATAT GATACCGAAT TGTATATAC 869
 CCAGATTAAG TATGCTATGT GCTTTGACAA AAAAAAAA AAAA 914

(2) 配列番号 25 の情報:
 (1) 配列の特徴:
 (A) 長さ: 192 アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (C) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: タンパク質

(x1) 配列: 配列番号 25
 Val Ser Lys Thr Ala Ala Arg Val Leu Leu His Leu Cys Phe Leu Trp Leu 1
 Leu Val Ser Ala Ile Phe Ile Lys Ser Ala Asp Cys Arg Ser Trp Lys 20
 Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35
 Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val 50
 Ser Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Thr Gly Asn Asn His 65
 70
 75

Phe Gly Asn Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn 95
 Leu His Ser Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 110
 100
 Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 115
 120
 Ser Thr Asp His Lys Gly Ser Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile 130
 135
 Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe 145
 150
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly 160
 165
 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180
 185
 190

(2) 配列番号 26 の情報:
 (1) 配列の特徴:
 (A) 長さ: 704 塩基対
 (B) 型: 複製
 (C) 数の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: Thella plicata 指標タンパク質 PSD-Tp4 cDNA
 (iii) ハイボセテイング: NO
 (iv) アンチセンス: NO
 (ix) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: CDS
 (B) 存在位置: 3..416

(xi) 配列: 配列番号 26
 AG AAT CCC CAC AAT GCA ACA TCT GCA CTT GGT GCA GGC CTT GAG GGA 47
 Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Pro Glu Gly 195
 200
 GCC AAT CTC ACC AAT AAG ACT GGT AAT AAC CTT TTT GCG AAT AAT GCT 95
 Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Ile Ala 210
 215
 GTG TTT GAT GAT GAT CTT AAT ACT CTT GAC AAC AAT CTT CAC TCT CTT TCT 143
 Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Ser 225
 230
 GTT GGA ACA CCG CCG GGC TTT TAC TTC TAT GAC ATG AAG GAT ACC TTC 191
 Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asp Thr Phe 240
 245
 AAT GCT TGG CTT GGT TTT ACA TTT GTC CTC AAT TCA ACT GAT CAC AAG 239
 Asn Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys 250
 255
 260
 265
 270

GGC ACC ATT ACT TTC TAT GGA GCA GAT CCA ATC CTG AAC AAG TAC AGA 287
Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg 285
275
GAT ATA TCT GTT GGT GGA ACA GGG GAT TTC TTG ATG GCC AGA GGA 335
Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly 290
295
ATT GCC ACC ATT TCT ACT GAT TCA TAT GAG GGA GAT GTT TAT TTC AGG 363
Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg 310
315
CTT AGG GTC AAT ATC ACA CTC TAT GAG TCT TAC TAAATGCAA TTTCCTCTGT 436
Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 320
325
ATTACTAGCT TATAGGAGTC ATTCCCTGGT TCAATGCTCA GGGCTGCGA TTAATGCAATT 496
TGAAGATGGT TTTCATATAT GSAGCATGTA TTCTAATTTG AAGAGCCCTC AAGCAAGTGC 556
ATTITACGGA GTTATGTTT GCCCTCAGC ATATATNGTT TTCAATATCC TCTATCAAG 616
TCATATGATG TATGAGGATC CATTTGGAT AATTATAGCA ASCTATTTT ATTAATATTA 676
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 704

Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe Arg Leu 125
115
Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 135
130

(2) 配列番号 28 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 820塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Thuja plicata 指標タンパク質 PSD-Tp5 cDNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 43..612

(xi) 配列: 配列番号 28:

GTCTAATGCA GAGGAAATTC CATTATTTT TTACCAATG CA ATG AAA GCC ATT 54
Met Lys Ala Ile 110
AGA GTT CTG CAT TTA TGC TTT CTA TGT CTT CTA GTS TCT GCA ATC TTG 102
Arg Val Leu His Leu Cys Phe Leu Cys Leu Val Ser Ala Ile Leu 145
140
CTA AAA TCT GCA GAT TGC CAT AGC TGG AAA ARG ANG CTT CCA ANG CCC 150
Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Ser Trp Lys Lys Leu Pro Lys Pro 160
165
TGC AAG AAT CTT GTG TTA TAT TTC CAT GAT ATA ATC TAC AAT GGC AAA 198
Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Lys 175
180
AAT GCA GAG AAT GCA ACA TCT GCA CTT GTT GCA GGC CTT GAG GGA GCC 246
Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Pro Glu Gly Ala 200
205
AAT CTC ACC ATT ATG ACT GGT AAT AAC CAT TTT GGG AAT CTT GCT GTG 294
Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Leu Ala Val 210
215
TTT GAT GAT CCT ATT ACT CTT GAC AAC AAT CTC CAC TCT CTT CCT GTG 342
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Pro Val 225
230
GGA ACA CTT CAG GGA TTT TAC TTG TAT GAC ATG ARG AAC ACC TTC AGT 390
Gly Arg Ala Glu Gly Phe Thr Tyr Asp Met Lys Asn Thr Phe Ser 245
250
GCT TGC CTT GGC TTC ACA TTT GTG CTG AAT TCA ACT GAT CAC AAG GGC 438
Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly 255
260

(2) 配列番号 27 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 138アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 27:

Asn Ala His Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Pro Glu Gly Ala 15
1
5
Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn His Phe Gly Asn Ile Ala Val 30
20
Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His Ser Pro Ser Val 45
35
40
Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asp Thr Phe Asn 60
50
55
Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp His Lys Gly 80
65
70
Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr Lys Tyr Arg Asp 95
85
90
Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg Gly Ile 110
100
105

ACC ATT ACT TTC TAT GCA GCA GAC CCA ATC CTG ACC AAG TAC AGA GAC 486
 Thr Ile Thr Phe Asn-Gly Ala Asp-Pro Ile Leu Thr Lys-Tyr Arg Asp 285
 275
 ATA TCT GTT GGT GCA GCA GCA GAT-ATC TTG ATG ACC AGA GGA ATT 534
 Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met-Ala Arg Gly Ile 294
 290
 GGC ACC ATT TCT ACT GAT TCA TAT GAG GGA GAA GTT TAT TTC AGG GTT 582
 Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Glu Val Tyr Phe Arg Leu 310
 305
 AGG GTC ATC ATC ACA CTC TAT GAG TGT TAC TGGGAAAG CTGCTGCTT 632
 Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 325
 TCTCTGATG TCTCTGTTT GGGTGCTTT GAGGAATAG TCTGGCTTC AATGCTCTG 692
 TATGTAGTAA CAGTGGCAAT GAGATCTAT TTGAAGATA TGAAGATA GTCTATAT 752
 AATATGAT TGAAGCAAT GAGATCTTT TTAGTAGCT CTTCATTC-AAGAAAAA 812
 AAAAAA 820

(2) 配列番号 29 の情報:

- (1) 配列の特徴:
 (A) 長さ: 1907 ミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (C) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 29:

Met Lys Ala Ile Arg Val Leu His Leu Cys Phe Leu Cys Leu Leu Val 1
 10
 Ser Ala Ile Leu Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Ser Trp Lys Lys Lys 25
 20
 Leu Pro Lys Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile 35
 30
 Tyr Asn Gly Lys Asn Ala-Glu Asn Ala Thr-Ser-Ala-Leu Val-Ala Ala 40
 35
 Pro Glu Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly 50
 45
 Asn Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn Leu His 60
 55
 Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Glu Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys 70
 65
 Asn Thr Phe-Ser Ala Trp Lys Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn-Ser Thr 80
 75
 115

Asp His Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile Leu Thr 130
 125
 Lys Tyr Arg Asp Ile-Ser Val Val Gly Thr Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met 145
 140
 Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ser Tyr Glu Gly Glu Val 155
 150
 Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 175
 170
 180
 185
 190

(2) 配列番号 30 の情報:

- (1) 配列の特徴:
 (A) 長さ: 1013 塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: Thujia plicata 指標タンパク質 PSD-Tp6 cDNA
 (iii) ハイボセセンス: NO
 (iv) アンチセンス: NO
 (12) 配列の特徴:
 (A) 特徴を表す記号: CDS
 (B) 存在位置: 47..616

(xi) 配列: 配列番号 30:

CTCAGTCZAA TTGAGCGAA ATTCACATTA TTTTTCOA ATAGCA ATG AAA GCT 55
 Met Lys Ala
 ATT AGA GTT CTG CAA TTA TGC TTT CTA TGG GTT CTA GTA TGT GCA ATC 101
 Ile Arg Val Leu Gln Leu Cys Phe Leu Trp Leu Val Ser Ala Ile 195
 200
 TTG CTA AAA TCT GCA GAT TGC CAT AGC TGG AAA MAG MAG CTT CCA MAG 151
 Leu Leu Lys Ser Ala 215
 210
 CCC TGC AAG AAT CTT GTG TTA TAT TTC CAT GAT ATR ATC TAC AAT GGC 199
 Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn Gly 230
 235
 AAA AAT GCA GAG AAT GCA ACA TCT GCA CTT GTT GCA GCC CCT GAG GCA 247
 Lys Asn Ala Glu Asn Ala Thr Ser Ala Leu Val Ala Ala Pro Glu Gly 250
 255
 GCC AAT CTC ACC AAT ATG ACT GGT AAT AAC CAT TTT GGG AAT CTT GCT 295
 Ala Asn Thr Ile Met Thr Gly Asn Asn His Phe Gly Asn Leu 265
 260

GTT TTG CTG AAT GCT ATA GAT TCC GAT ACT ACA AAA AAG CTT CCA 151
Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp Cys His Ser Arg Lys Lys Lys Leu Pro 215
AAG GCA TCT AGG AAT CTT GTT TTG TAT TTT CAT GAT ATT ATC TAC AAT 199
Lys Pro Cys Arg Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp Ile Ile Tyr Asn 230
GCT AAA AAT GCA GGC AAT ACA ACA TCT ACG CTT GTT GCA GCC CCI CAA 247
Gly Lys Asn Ala Gly Asn Ala Thr Ser Thr Thr Val Ala Ala Pro 245
GGA GCT AAT CTC ACC AAT ATG ACT GGC AAT TAC CAT TTT GGA GAT CTG 295
Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Gly Asn Tyr His Phe Gly Asp Leu 285
GCT CTG TTT GAT GAT CTT AAT CTT GAT GAC AAC AAT CTT CAT TCT CCT 343
Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Val Asp Asn Asn Leu His Ser Pro 280
CCT GTG GGA AGA GCT CAG GGC TTT TAC TAT GAC ATG AAG AAT ACA 391
Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp Met Lys Asn Thr 295
TTC AGT CCT TGG CTT GGG TTC ACA TTT GTG CTG AAC TCA ACA GAT TAT 439
Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Thr Phe Val Leu Asn Ser Thr Asp Tyr 310
AAA GCG ACT AAT ACT TTC GGT GGA GCA CAC CCA AAT TTG GCT AAG TAC 487
Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Lys Tyr 325
ACA GAT ATA TCT CTT GTG GGT GGT ACT GGA GAT TTC TTG ATG GCA AGA 535
Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Thr Gly Asp Phe Leu Met Ala Arg 345
GGA AAT GCT ACA ATC GAT ACT GCA PRT GAG GGA GAT GTT TAT TTC 583
Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr Asp Ala Tyr Glu Gly Asp Val Tyr Phe 360
AGG CTA AGG GTG AAT ATC ACA CTC TAT GAG TGT TAC TGAATCCTGG 629
Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 375
GTATCTATG TAGAATACT CAATCTAAT TGGCTAATAT ATTTCAGAG CATAGTAGT 689
TAGTTTAT AACTAGTAG TGACCATAGA GAUATTCGA AACTTGGGTG CTCTGCAAA 749
GTTTCTAT TTTCAATAA AGTCTCTCG ACTATACAT TTATGATTC TTGAGATTC 809
TCTGCTAT TACTTATGA ATAGACTATT TTAAATAG TTTTACAG TTAAAGTT 869
GTCBAAAAA AAAAAAAAAA A 890

(D) トポロジ：直鎖状
(11) 配列の種類：タンパク質
(x1) 配列：配列番号 3 5 :
Met Ala Ile Trp Asn Gly Arg Val Leu Asn Leu Cys Ile Leu Trp Leu 1
15
Leu Val Ser Ile Val Leu Leu Asn Gly Ile Asp Cys His Ser Arg Lys 20
25
Lys Lys Leu Pro Lys Pro Cys Arg Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp 35
40
Ile Ile Tyr Asn Gly Lys Asn Ala Gly Asn Ala Thr Ser Thr Leu Val 50
55
Ala Ala Pro Gln Gly Ala Asn Leu Thr Ile Met Thr Thr Gly Asn Tyr His 65
70
Phe Gly Asp Leu Ala Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Val Asp Asn Asn 85
90
Leu His Ser Pro Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp 100
105
Met Lys Asn Thr Phe Ser Ala Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn 115
120
Ser Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Gly Gly Ala Asp Pro Ile 130
135
Leu Ala Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Thr Gly Asp Phe 145
150
Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Asp Thr Asp Ala Tyr Glu Gly 165
170
Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr 180
185

(2) 配列番号 3 6 の情報：

(1) 配列の特徴：

(A) 長さ：30アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：関連なし

(D) トポロジ：関連なし

(11) 配列の種類：ペプチド

(111) ハイボセディカル：NO

(112) アンチセンス：NO

(113) フラグメント型：Forsythia intermedia (t)-ピノシノール/(t)-ラリシ
レシノールレダククターゼ由来のN末端配列

(x1) 配列：配列番号 3 6 :

(2) 配列番号 3 5 の情報：

(1) 配列の特徴：

(A) 長さ：192アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg
1 5 10 15

Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr
20 25 30

(2) 配列番号37の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 16アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号37:

Phe Met Asp Ile Ala Met Xaa Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys
1 5 10 15

(2) 配列番号38の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 13アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号38:

Leu Pro Xaa Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met
1 5 10

(2) 配列番号39の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 12アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(A) 長さ: 8アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 関連なし

(D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号39:

Glu Val Val Gln Xaa Xaa Glu Lys
1 5 10

(2) 配列番号40の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 10アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia(+)-ヒノレシノール/(+)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部トリプシンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号40:

Tyr Xaa Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg
1 5 10

(2) 配列番号41の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 12アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 1:

Met Gly Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met
1 10

(2) 配列番号 4 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 7 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 2:

Met Asp Pro Ala Lys Lys Phe Met
1 5

(2) 配列番号 4 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 7 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 関連なし
- (D) トポロジー: 関連なし
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: Forsythia intermedia (t)-ピノレシノール/(t)-ラリシ
レシノールレダクターゼ由来の内部臭化シアアンフラグメ
ント

(xi) 配列: 配列番号 4 3:

Met Leu Ile Ser Phe Lys Met
1 5

(2) 配列番号 4 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLN5J
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 4:

ATGATGCGG GACACGCTA

20

(2) 配列番号 4 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLR14RJ
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 5:

GTTCATGCG NATTCGAT

19

(2) 配列番号 4 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 記載: PCRプライマー-PLR15RJ
- (iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号 4 6:

TCCTCAAG TCACCTCC

(2) 配列番号47の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1060塩基対
- (B) 型: 複製
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F11
- (iii) ハイブリゼーション: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 28..963

(11) 配列番号47:

ATTGGGAC GAGGAGAC CACAGC ATC GGA AAA ACC RAR GTT TTG ATC 51
Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile 195
ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT PAA GCA AGT TTA 99
Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu 205
GCT CAA GGT CAT ACA TAC ATT CTG CAT AGG CCT GAA ATT GGT 147
Ala Gln Gly His Gln Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Gln Ile Gly Val 225
GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATC TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 195
Asp Ile Asp Lys Val Gln Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala 235
CAT CTT GAT TCT TCT TTC ATG GAT TTC AAC AGT CTG GTC GAG GGT 243
His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn 255
GTC AGC CTC GTA GAC GTA ATC ACC GCG ATT TCT GGT GTC CAC ATT 291
Val Lys Leu Val Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile 280
CGA ACC CAT CAA ATT CTT CTA CTC ATG CTT GTT CAA GCT ATT AAT 339
Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val Gln Ala Ile Lys 295
GAG GCT GGA AAT GTC AAG ACA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATG GAT 387
Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Gln Phe Gly Met Asp 310
CCT GCA AAA TTT ATG GAT ACC GGC ATG GAA CCC GGA AAG GTA ACR CTT 435
Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Gln Pro Gly 325
GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGG AAA GCA ATT GAA AGC CTT GCG ATT CCT 483
Asp Gln Lys Met Val Val Val Lys Ala Ile Gln Lys Ala Gly Ile Pro 330

TTT ACA TAT GTC TCT GCA AAT TGC TTT GGT TAT TTC TTG GGA GGT 345
Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly 350
CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT TCT AGA GAT TTT GTC ATT ATA 579
Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile 365
CAT GCA GAT GGT AAC AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT GAT ATA 627
His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Gln Asp Asp Ile 385
GCA ACT TAT GGC ATC ATC AAA ACA ATT TAT GAT CCA ACA ACC CTC AAC AAG 675
Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys 390
ACA ATC TAC ATT AGT CCT CCA AAA AAC ATC GTT TCA CAA ACA GAA GTT 723
Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Gln Arg Gln Val 410
GTT CAG ACA TGG CAG AAG CTT ATT GGG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA 771
Val Gln Thr Trp Gln Lys Leu Ile Gly Lys Gln Leu Gln Lys Thr 435
CTC TCG AAG CAA GAT TTT TTA GGC TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT 819
Leu Ser Lys Gln Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Gln Leu Gln Tyr Ala 445
CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TCC 867
Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys 465
CTT ACG AGT TTT GAG ATA GGA CAT GAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT 913
Leu Thr Ser Phe Gln Ile Gly Asp Gln Gln Gln Ala Ser Lys Leu Tyr 475
CCT CAG GAT TAT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG CTT TAC GTG 963
Pro Gln Val Lys Tyr Thr Ser Val Gln Gln Tyr 500
TACTGGAAG CTTCCATTA TTATGTAT ATATTTTAA TCAGTATGA GTTTAAAT 1023
TCCTTAATA ATATGTGTTG ATTTCCTT CCAAAA 1060

(2) 配列番号48の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(11) 配列番号48:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15

Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile
20 30
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu
35 45
Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys
50 55 60
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile
65 70 75
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln
80 85 90 95
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe
100 105 110
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala
115 120 125
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys
130 135 140
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys
145 150 155 160
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu
165 170 175
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala
180 185 190
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile
195 200 205
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys
210 215 220
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile
225 230 235 240
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala
245 250 255
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr
260 265 270
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp
275 280 285
Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val
290 295 300
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val
305 310

(2) 配列番号49の情報:
(i) 配列の特徴:
(A) 長さ: 1112塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直線状
(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F12
(iii) ハイボセティカル: NO
(iv) アンチセンス: NO
(iz) 配列の特徴:
(A) 特徴を載す記号: CDS
(B) 存在位置: 44..979
(xi) 配列: 配列番号49:
ATTTCGGCAC GAGCTCTGTC CCGACACAGCA AAAACACAGA GAG ATG GCA AAA AGC
35 Met Gly Lys Ser
AAA GTT TTG ATC ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT
103 Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Val
320 325 330
AAG GCA AGT TTA GCT CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG CCT
151 Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro
335 340 345
GAA ATT GGT GTT GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATG CTA ATR TCA ATT AAA
199 Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys
350 355 360
ATG CAA GCA GCT CAT GTT CTA TCT GCT TCT TTC AAC GAT TTC AAC AGT
247 Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser
365 370 375 380
CTG GTC GAG GCT GTC AAG CTC GTA GAC GTA GTA ATC AGC GGC ATT TCT
295 Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser
385 390 395
GGT GTT CAT ATT CGA AGC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GTT
343 Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val
400 405 410
CAA GCT ATT AAA GAG GCT GGA AAT GTC AAG AGA TTT TTA GCA TCT GAG
391 Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu
415 420 425 430

(11)配列の種類：タンパク質

(x1)配列：配列番号50

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15
1 10
Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile 20 30
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 35 45
Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 50 60
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 65 75
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln 80 90
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 100 110
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 115 125
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 130 140
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 145 155
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu 160 175
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 180 190
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 195 205
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys 210 220
Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val Val Gln Thr Thr Trip Glu Lys Leu Ile 225 235
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala 240 255
Ser Val Lys Glu Leu Gln Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr 260 270
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp 275 285
Gln Glu Gln Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val 290 300
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 305 310

TTT GGA ATG GAT CTT GCA AAA TTT ATG GAT AGC GGC ATG GAA CCC GCA 439
Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly 440
435
AAG GTA ACA CTT GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGC AAA GCA ATT GAA AAG 487
Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys 490
445
GCT GCG ATT CTT TTC ACA TAT GTC TCT GCA ATY TGC TTT GCT GGT TAT 535
Ala Gly Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asp 475
465
TTC TGC GCA GGT CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT ACA GAT 583
Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp 490
480
TTT GTC ATT ATA CMT GGA GAT GGT AAC AAA GCA ATR TAT AAC ATT 631
Phe Val Ile Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asp 505
495
GAA GAT GAT ATA GCA ACT TAT GTC ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AGA 679
Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg 520
510
ACC CTC AAC AAG ACA ATC TAC ATT AGT CTT CCA AAA AAC ATC CTT TCA 727
Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser 535
530
CAA ACA GAA CTT GTT CAG ACA TCG GAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTG 775
Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Thr Glu Lys Leu Ile Gly Lys Lys 555
545
CAG AAA ATT ACA CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCC TTC GTG AAA GAG 823
Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu 565
560
CTC GAG TAT GAT CAG CAA GTG GCA TTA AGC CAT TAT CMT GAT GTC AAC 871
Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Ser His Tyr His Asp Val Asn 585
575
TAT CAG GGA TGC CTT ACG AGT TTT GAG ATA GCA GAT GAA GAA GCG CCA 919
Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Thr Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Glu Ala 595
590
TCT AAA CTT TAT CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC 967
Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr 620
605
AAG CGT TAC GTG TAGTGAAG CTTCCATTA TTATGTAT AATATTGAA 1019
Lys Arg Tyr Val
TCAATATGTA GTTATTAATT TCGTATATA ATATGATG ATTTTCTT CAAACGATG 1079
GTCAATGAA ATGCATTTT GAGTCAAA AAA 1112

(2)配列番号50の情報:

(1)配列の特徴:

- (A)長さ: 312アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)トポロジー: 直鎖状

(2)配列番号51の情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:1124塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-Fi3

(iii) ハイポセディカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

(A)特徴を表す記号:CDS

(B)存在位置: 29..964

(xi)配列：配列番号51：

<p> ANTTGGCCAC GAGGAAAC AGAGAGS ATG GGA AAA AGC AAA GTT TTG ATC Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile 315 </p>	<p> ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GCG AGG AGA TTG GTT ADG GCA AGT TTA Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Ala Leu Val Lys Ala Ser Leu 325 </p>	<p> GCT CAA GGT CAT GAA ACC TAC ATT CTG CAT AGG CCT GAA ATT GGT GTT Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val 340 </p>	<p> GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATG CTA ATA TCA TTT AAA ATC CAA GCA GCT Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala 355 </p>	<p> CAT CTT GTA TCT GGT TCT TTC AAG GAT TTC AAC AGT CTG GTC GAG GCT His Leu Val Ser Gly Ser Phe Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala 370 </p>	<p> GTTC AAG CTC GTA GAC GTA GTA ATC AGC GCC ATT TCT GGT GTT CAT ATT Val Leu Lys Leu Val Asp Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile 385 </p>	<p> 390 </p>	<p> 395 </p>	<p> 400 </p>
--	--	--	--	--	---	--------------	--------------	--------------

340	CGA AGC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GTT GAA GCT ATT AAA Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu Leu Val Glu Ala Ile Lys 405
388	GAG GCT GGA AAT GTC AAG AGA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GCA ATG GAT Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp 420
436	CCT GCA AAA TTT ATG CAT AGC GGC ATG GAA CCC GGA AAG GTA ACA CTT Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu 435
484	GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGG AAA GCA ATT GAA AAG CTT GGG ATT CGT Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro 450
532	TTT ACR TAT GTC TCT GCA AAT TGC TTT GCT GGT TAT TTC TTG GGA GGT Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly 465
580	CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT AGA GAT TTT GTC ATT ATA Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile 485
628	CAT GGA GAT GGT AAC AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA CAT CAT ATA His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile 500
676	GCA ACT TAT GCT ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA ACA ACC CTC AAC AAG Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys 515
724	ACA ATC TAC ATT AGT GCT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA ACA GAA GTT Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val 530
772	GTT CAG ACA TCG CAG AAG CTT ATT CGC AAA GAA CTC GAG AAA ATT ACA Gly Thr Cys Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr 545
820	CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GGC TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala 565
868	CAG CAA GTG GGA TTA ACC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TGC Gln Glu Val Glu Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys 580
916	CTT ACC AGT TTT GAG ATA GGA GAT CAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr 595
964	CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG COT TAC GTG Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 610
1024	TTAGTGTGAAG CTTTCACATA TTATGTAT AAATTTTAAA TCAAGTGTGA GTTTAAATTT TCGTTAAATA AAATGTCTG AATTTTCCTT CAACGACTG CTCGATGAA ATCGAATTTT ATGACTGCTT TCTCCCAAT ATTAGTCCAA ATAAAAAAA
1084	
1124	

Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Val Gly Leu Ser His Tyr
260
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp
275
Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val
290
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val
305

(2) 配列番号 53 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1097塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F14

(iii) ハイボセディカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
- (B) 存在位置: 29..964

(xi) 配列: 配列番号 53

ATTTCGGCAC GAGGAGAGAG ATG GGA AAA AGC AAA GTT TTG ATC
Met Gly 315 52
ATT GGG GGT ACA GGG TAC TTA GGG AGG AGA TTG GTT AGC GCA AGT TTA
Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala 335 100
GCT GAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGC OCT GAA ATT GGT GTT
Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val
340 345 148

(2) 配列番号 52 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312アミノ酸
- (B) 型: ミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 52

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly
1 15
Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile
20 25
Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu
35 40
Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys
50 55
Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile
65 70
Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln
85 90
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe
100 105
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala
115 120
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys
130 135
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys
145 150
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Lys Glu Phe Phe Gly Lys Ile Leu
165 170
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala
180 185
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile
195 200
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys
210 215
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile
225 230
Gly Lys Glu Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala
240 245 250 255

GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATC CTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GGA GCT
 Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Glu Gly Ala 385
 396
 CMT CTT GTA TCT GGT TCT TCC TAG GAT TTC AAC AGT CTG CTC GAG GCT
 His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala 380
 370
 GTC TAG CTC GTA GAC GTA ATC AGC GCC ATT TCT GGT GTT CMT ATT
 Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile 400
 388
 CGA AGC CMT CAA ATT CTT CTT CAA CTC TAG CTT GTT GAA GCT ATT AAA
 Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys 415
 405
 GAG CTT GCA AAT GTC AAG AGA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATC GAT
 Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp 430
 420
 CTT GCA AAA TTT ATG GAT AGC GCC AAG GAA CCC GCA AAG GTA ACA CTT
 Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu 445
 435
 GAT GAG AAG ATG GTG GTA AGC AAA GCA ATT GAA AAG GCT GGG ATT CTT
 Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro 460
 450
 TTC ACA TAT CTC TCT CCA AAT TCC TTT CTT GGT TAT TTC TGC GCA GCT
 Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly 480
 465
 CTC TGT CAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT AGA GAT TTT GTC ATT ATA
 Leu Cys Glu Phe Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile 495
 485
 CMT GGA GAT GGT AAG AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT GAT ATA
 His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile 510
 500
 GCA ACT TAT GCC ATC AAA ACA AAT AAT GAT CCA AGA ACC CTC AAC AAG
 Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys 525
 515
 ACA ATC TAC ATT CTT CCA AAA AAG ATC CTT TCA CAA AGA GAA GTT
 Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val 540
 530
 GTT CAG ACA TCG GAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTC CAG AAA ATT ACA
 Val Glu Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr 560
 545
 CTC TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCC TCC GTG AAA CAG-CTC GAG TAT CTT
 Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser 570
 565
 CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TGC
 Glu Glu Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys 590
 580
 CTT ACG AGT TTT GAG ATA GGA GAT GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT
 Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr 595
 600

CCA GAG GTT AAG TAT ACC AGT CTC GAA GAG TAC CTC AAG CCT TAC CTC
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 610
 605
 TACTGGAG CTTTCGATTA TTATGTGAT AGATTTTAA TCAATATGA GTTTTAAIT
 TCTTAAATA AATATGTTG AATTTTCTT CAAAGAGTG GTTGATGAA ATGGAAITTT
 CAAAAAAA AAA 1084
 1097
 (2) 配列番号 54 の情報：
 (1) 配列の特徴：
 (A) 長さ：312アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) トポロジー：直鎖状
 (11) 配列の種類：タンパク質
 (x1) 配列：配列番号 54：
 Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15
 1
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Glu Glu Gly His Glu Thr Tyr Ile 25
 20
 Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 45
 35
 Ile Ser Phe Lys Met Glu Glu Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 60
 50
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 80
 65
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu 95
 85
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 110
 100
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 125
 115
 Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 140
 130
 Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 160
 145
 Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu 175
 165
 Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 185
 180
 Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 205
 195

Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys
210 215 220
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile
225 230 235
Gly Lys Gln Leu Gln Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala
240 245 250
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr
255 260 265
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp
270 275 280
Glu Glu Gln Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val
285 290 295
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val
300 305

(2) 配列番号 5.5 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 1109塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F15

(iii) ハイボセディカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ix) 配列の特徴

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 31..986

(x) 配列: 配列番号 5.5

AATTCGGCAC GAGGAGAAA ACAGAGAGAG ATC GGA AAA ACC AAA GTT TTG ATC
315 320
Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile
102
ATT GGG GGT ACG GGG TAC TTA GGG AGG ACG TTT GGT ACG GCA AGT TTA
325 330
Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu
150
GCT CAA GGT CAT GAA ACA TAC ATT CTG CAT AGG CTT GAA ATT GGT GTT
335 340
Ala Gln Gly His Glu Thr Tyr Ile 345
350
GAT ATT GAT AAA GTT GAA ATG CTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GCA GCT
355 360
Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala
246
CAT CTT CTA TCT CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
365 370
His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala
294
GTC AAG CTC GTA GAC GTA ATC AGC GGC ATT TCT GGT GTT CAT ATT
375 380
Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile
385 390
GGA ACC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GGT GAA GCT ATT AAA
395 400
Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys
342
GAG GGT GGA ATT GTC AAG AAA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATG GAT
405 410
Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 415
420
CCT GCA AAA TTT ATC CAT ACG GGC ATG GGA CCC GCA AAG GCA ACA CTT
425 430
Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu
438
GAT GAG AAG ATC CTC GTA ACG AAA GCA ATT GAA AAG CCT GGG ATT CTT
435 440
Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro
486
TTC ACA TAT CTC TCT GCA AAT TGC TTT GCT GGT TAT TTC TTC GGA GGT
445 450
Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly
534
CTC TGT GAA TTT GGC AAA ATT CTT CTT TCT ACG GAT TTT GTC ATT ATA
455 460
Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile
582
CAT GGA GAT GGT AAG AAA GCA ATR TAT AAT GAT CCA AAG ACC CTC AAG
465 470
His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile
630
GCA ACT TAT GGC ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AAG ACC CTC AAG
475 480
Ala Thr Tyr Ile Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys
678
ACA ATC TAC ATT AGT CTT CCA AAA AAT AAT GAT CCA AAG ACC CTC AAG
485 490
Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Lys Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val
726
GTT CAG ACA TGG GAG CAT ATT GGG AAA GAA CTG CAG AAA ATT ACA
495 500
Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile Gly Lys Leu Glu Lys Ile Thr
774
505 510
515 520
525 530
535 540
545 550
555 560

CTC TCC AAC CAA CAT TTT TTA GCC TCC GAG AAA GAG CTC GAG TAT GCT 822
 Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala 575
 565
 CAG CAA GTG GGA TTA AGC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TCC 870
 Glu Glu Val Glu Lys Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys 590
 585
 CTT ACG AGT TTT CAG ATA GGA CAT GAA GAA GAG GCA TCT AAA CTT TAT 918
 Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr 605
 595
 CCA GAG GAT AAG TAT ACC AGT GTG GAA GAG TAC CTC AAG GAT TAC GTG 966
 Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 620
 615
 TACTCCAAAG CTTTCCATTA TTATGCTAT AATATTAAA TCAGTAGTA GTTTAAATT 1026
 TCGTAAATA AATGCTGTC AATTTGCTT CAAACGACG GTCGATGAA ATCGAATTTT 1086
 GAATGCTCT TCTCCAAA AAA 1109

(2) 配列番号 56 の情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 312 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (11) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 56:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15
 1
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala Glu Glu His Glu Thr Tyr Ile 30
 20
 Leu His Arg Pro Glu Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 45
 35
 Ile Ser Phe Lys Met Glu Glu Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 60
 50
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 80
 65
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Glu Ile Leu Leu Glu 95
 85
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 110
 100
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala 125
 115
 Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys 140
 130
 Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys 160
 145 150 155

Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Glu Phe Gly Lys Ile Leu 175
 165
 Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala 190
 185
 Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile 205
 200
 Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys 220
 215
 Asn Ile Leu Ser Glu Arg Glu Val Val Glu Thr Thr Glu Lys Leu Ile 240
 235
 Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala 255
 245
 Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Tyr Ala Glu Glu Val Gly Leu Ser His Tyr 270
 260
 His Asp Val Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp 285
 275
 Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val 300
 290
 Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val 310
 305

(2) 配列番号 57 の情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1107 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: Forsythia intermedia cDNA PLR-F16
- (iii) ハイボセティカル: NO
- (iv) アンセンス: NO
- (ix) 配列の特徴:
- (A) 特徴を表す記号: CDS

(B)存在位置: 27, 962

(1)配列: 配列番号57

AATGCCAC GAGAACAG AGAGAG ATG GGA AAA AGC AAA GAT TTG ATC ATT 53
 Met Gly Lys Ser Lys Val Leu 320
 GCG GGT ACA GCG TAC TTA GCG AGC ACA TCG GTT AGC GCA AGT TTA GCT 101
 Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Ala
 325 330 335
 CAA GGT CAT GAA ACA TAC TAT CTT AGC CTT GAA ATT GGT GTT GAT 149
 Gln Gly His Gln Thr Tyr Ile Leu His Arg Pro Gln Ile Gly Val Asp
 340 345 350 355
 ATT GAT AAA GTT GAA ATG GTA ATA TCA TTT AAA ATG CAA GGA GCT CAT 197
 Ile Arg Lys Val Gln Met Leu Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His
 355 360 365
 CTT GTA TCT GGT TCT TTC AAG GAT TTC AAC AGT CTG CTC GAG GCT GTC 245
 Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys Asp Phe Asn Ser Leu Val Gln Ala Val
 370 375 380 385
 AAG CTC GTA CAC GTA ATC AGC GGC ATT TCT GGT GTT CAT ATT CCA 293
 Lys Leu Val Arg Val Val Ile Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg
 390 395 400
 AGC CAT CAA ATT CTT CTT CAA CTC AAG CTT GTT GAA GCT ATT AAA GAG 341
 Ser His Gln Ile Leu Leu Gln Leu Lys Leu Val Gln Ala Ile Lys Gln
 405 410 415
 GGT GGA AAT CTC AAG AGA TTT TTA CCA TCT GAG TTT GGA ATG GAT CTT 389
 Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe Leu Leu Pro Ser Gln Phe Gly Met Asp Pro
 420 425 430
 GCA AAA TTT ATG GAT ACG GGC ATG GAA CCG GGA AGC GTA ACA CTT GAT 437
 Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala Met Gln Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp
 440 445 450
 GAG AAG ATG CTC GTA ACG AAA CCA ATT GAA AAG GGT GCG ATT CTT TTC 485
 Glu Lys Met Val Val Arg Lys Ala Ile Gln Lys Ala Gly Ile Pro Phe
 455 460 465
 ACA TAT GTC TCT GCA AAT TGC TTT GGT TAT TTC TTA GGA GGT CTC 533
 Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu
 470 475 480
 TGT CAA TTT GCG AAA AAT CTT CTT TCT AGC GAT TTT CTC ATT ATA CAT 581
 Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His
 485 490 495
 GGA GAT GGT AAG AAA AAA GCA ATA TAT AAC AAT GAA GAT GTA GCA 623
 Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Asn Asn Gln Asp Asp Ile Ala
 500 505 510
 ACT TAT GCG ATC AAA ACA ATT AAT GAT CCA AGA ACC CTC AAC AAG ACA 677
 Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr
 515 520 525

ATC TAC ATT AGT CCT CCA AAA AAC ATC CTT TCA CAA ACA GAA GAT GTT 725
 Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys Asn Ile Leu Ser Gln Arg Gln Val Val
 530 535 540 545
 CAG ACA TCG GAG AAG CTT ATT GCG AAA GAA CTC CAG AAA ATT ACA CTC 773
 Gln Thr Trp Gln Lys Leu Ile Gly Lys Gln Leu Gln Lys Ile Thr Leu
 550 555 560
 TCG AAG GAA GAT TTT TTA GCC TCC GTG AAA GAG CTC GAG TAT GCT CAG 821
 Ser Lys Gln Asp Phe Leu Ala Ser Val Lys Gln Leu Gln Tyr Ala Gln
 565 570 575
 CAA CTG GGA TTA ACC CAT TAT CAT GAT GTC AAC TAT CAG GGA TGC CTT 869
 Gln Val Gly Leu Ser His Tyr His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu
 580 585 590
 ACG AGT TTT GAG ATA GGA GAT GAA GAG CCA TCT AAA CTT TAT CCA 917
 Thr Ser Phe Gln Ile Gly Asp Gln Gln Ala Ser Lys Leu Tyr Pro
 595 600 605
 GAG GTT AAG TAT ACC AGT GTC GAA GAG TAC CTC AAG CTT TAC CTG 962
 Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val Gln Tyr Leu Lys Arg Tyr Val
 610 615 620
 TAGTTGAAAG CTTTCACATTA TTTATGTAT ATATTTTAAA TCAATGATTA GTTTTAAATT 1022
 TCGTTTAAATA ATATGTGTG AATTTCCTT CAAACGATG GTCCATGGA ATCGAATTTT 1082
 GAACTCATCT TCTCCGAAA AAAAA 1107

(2)配列番号58の情報:

(1)配列の特徴:

(A)長さ: 312アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(C)トポロジー: 直鎖状

(1)配列の種類: タンパク質

(1)配列: 配列番号58:

Met Gly Lys Ser Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Leu Gly 15
 1 10
 Arg Arg Leu Val Lys Ala Ser Leu Leu Ala Gln Gly His Gln Thr Tyr Ile 20 30
 25
 Leu His Arg Pro Gln Ile Gly Val Asp Ile Asp Lys Val Glu Met Leu 35 40 45
 50
 Ile Ser Phe Lys Met Gln Gly Ala His Leu Val Ser Gly Ser Phe Lys 55 60
 65
 Asp Phe Asn Ser Leu Val Gln Ala Val Lys Leu Val Asp Val Val Ile 70 75 80
 85
 Ser Ala Ile Ser Gly Val His Ile Arg Ser His Gln Ile Leu Leu Gln 90 95
 100 105
 Leu Lys Leu Val Gln Ala Ile Lys Gln Ala Gly Asn Val Lys Arg Phe 110

(C41)

特表2001-507831

(C42)

特表2001-507831

Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Ala Lys Phe Met Asp Thr Ala
115 120
Met Glu Pro Gly Lys Val Thr Leu Asp Glu Lys Met Val Val Arg Lys
130 140
Ala Ile Glu Lys Ala Gly Ile Pro Phe Thr Tyr Val Ser Ala Asn Cys
145 150
Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Gly Leu Cys Gln Phe Gly Lys Ile Leu
155 160
Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ile His Gly Asp Gly Asn Lys Lys Ala
165 170
Ile Tyr Asn Asn Glu Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Ala Ile Lys Thr Ile
180 185
Asn Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Ile Tyr Ile Ser Pro Pro Lys
190 195
Asn Ile Leu Ser Gln Arg Glu Val Val Gln Thr Trp Glu Lys Leu Ile
200 205
Gly Lys Glu Leu Glu Lys Ile Thr Leu Ser Lys Glu Asp Phe Leu Ala
210 215
Ser Val Lys Glu Leu Glu Tyr Ala Gln Gln Val Gly Leu Ser His Tyr
220 225
His Asp Val Asn Tyr Gln Gly Cys Leu Thr Ser Phe Glu Ile Gly Asp
230 235
Glu Glu Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Ser Val
240 245
Glu Glu Tyr Leu Lys Arg Tyr Val
250 255

(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 記載：「cDNA合成リンカープライマー」
(iii) ハイボセディカル：NO

(xi) 配列：配列番号59：

GTCTCGAGTT TTTTITTTT TTTTIT

26

(2) 配列番号60の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：「cDNA合成プライマー」

(iii) ハイボセディカル：NO

(xi) 配列：配列番号60：

GCACATACCA GTATGATATA G

21

(2) 配列番号61の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1190塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：Thuja plicata cDNA PLR-TpI

(iii) ハイボセディカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：13..951

(xi) 配列：配列番号61：

GCACATACCA GT ATG CAT AAC AAC ACC ACA CTT CTC ATA CTC GCG GCG
Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly
315 320

49

(2) 配列番号59の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：26塩基対

(B) 型：核酸

ACT GGT TAT ATA GGC AAA AGA ATT CTG BAF GGC ACT ATA TCT CTT GGC 96
 Thr Gly Tyr Ile Gly 330
 323
 CAG CCC ACT TAT CTT TTG TTC AGA CCA GAA CTG CTC TCT AAG ATT GAC 144
 His Pro Thr Tyr Val Leu Leu Phe Arg Pro Glu Val Val Ser Asn Ile Arg
 345
 335
 AAA GTG CAG AGC CTG TTA TAC TTC TAC AAA CAG CTT GGT GGC AAA CTT ATT 192
 Lys Val Gln Met Met Leu Tyr Phe Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Ile
 360
 370
 GAG GGT TCA TTG GAT GAC CAC CAA AGG CTT GTG GAT GCT CTG AAA CAA 240
 Glu Ala Ser Leu Asp Asp His Gln Arg Leu Val Asp Ala-Leu Lys-Gln
 375
 385
 GTG GAT GTT GTC ATA AGT GCT TTG GCA GGA GGT GTT CTA AGC CAC CAT 288
 Val Asp Val Val Ile Ser Ala Leu Ala Gly Gly Val Leu Ser His His
 390
 400
 ATA CTT GAA CAG CTC AAA CTA CTC GAA GGC ATC AAA GAA GGT GGA AAT 336
 Ile Leu Glu Gln Leu Val Glu Ala Ile Lys Lys Glu Ala Gly Asn
 405
 415
 ATT AAG AGR TTT CTT CCA TCT GAG TTT GGC AGC GAT CCA GAT ATT ATC 384
 Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Gln Phe Gly Met Asp Phe Asp Ile Asn
 425
 435
 GAG CAT GCA TTG CAA CTT GGT AGC ATT ACA TTC ATC GAT AAG AGR AAG 432
 Glu His Ala Leu Gln Pro Gly Ser Ile Thr Phe Ile Asp Arg Arg Lys
 440
 445
 GTT GCG COT GGC ATT GAA GCA GCA TCC ATT CTT TAC ACA TAT GTG TCT 480
 Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser
 455
 465
 TCA AAT ATG TTT GGT TAC TTT GCT GGA AGT TTA GCT CAA CTT GAT 328
 Ser Asn Met Phe Ala Gly Tyr Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp
 470
 480
 GGT CAT ATG ATG CTT CTT CCA GAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC 576
 Gly His Met Met Pro Pro Arg Asp Lys Val Ile Tyr Gly Asn Gly
 485
 490
 AAT CTT AAA GGT ATT TGG CTG GAT GAA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 624
 Asn Val Lys Gly Ile Trp Val Asp Glu Asp Asp Val Gly Thr Tyr Thr
 505
 515
 ATC AAA TCA ATT GAT GAT CCA CAA ACC CTT BAC AAG ACT AAG TAT ATT 672
 Ile Lys Ser Ile Asp Asp Pro Gln Thr Leu Asn Lys Thr Met Tyr Ile
 520
 530
 AGG CCA COT ATG BAF ATC CTT TCA CAG CAG GAA GTT ATA CAA ATA TGG 720
 Arg Pro His Met Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Val Ile Gln Ile Trp
 535
 545
 CAG AGR TTA TCA CAA CAA CAG CTC GAT AAA ATA TAC ATT TCT TCT CAA 768
 Glu Arg Leu Ser Glu Gln Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Ile Ser Ser Gln
 550
 555

GAC TTT CTT CCA GAT ATG AAA GAT AAA TCA TAT GAA GAG AAG ATT GTA 816
 Asp Phe Leu Ala Asp Met Lys Asp Lys Ser Tyr Glu Glu Lys Ile Val
 565
 575
 CCA TGT CAT CTC TAC CAA ATT TTC TTT AGR CCA GAT CTT TAC AAC TTT 864
 Arg Cys His Leu Tyr Gln Ile Phe Phe Arg Gly Asp Leu Tyr Asn Phe
 585
 595
 GAA ATT GGC CCC CAT GCT ATT GAA GCT ACC AAA CTT TAT CCA GAA CTC 912
 Glu Ile Gly Pro Asn Ala Ile Glu Ala Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val
 600
 605
 AAA TAC GTA ACC ATG GAT TCA TAT TTA GAG CCG TAT GTT TCAATATCTT 961
 Lys Tyr Val Thr Met Asp Ser Tyr Leu Glu Arg Tyr Val
 615
 625
 TCTAGTTTGT TATATGTTT TTCTACATGA TAATGTGGA GGTACTATT CAAATATTT 1021
 AGACTATGG CTCATTTTA BAATAGAGT ACATTTATT CCAATTTACT TACATATTT 1081
 TTACTTCAAT ATTCTACTCA ATATAGACTT GGTATPAGA ATATGATAT ATATGATAT 1141
 TATATATTT TATAGATCTT ATTITTAATA AAAAAAAAA AAAAAAAAA 1190

(2) 配列番号 6 2 の情報:
 (1) 配列の特徴:
 (A) 長さ: 313 アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (C) トポロジー: 直鎖状
 (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 6 2:
 Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Thr Gly Tyr Ile 15
 Gly Lys Arg Ile Val Asn Ala Ser Ile Ser Leu Gly His Pro Thr Tyr 30
 Val Leu Phe Arg Pro Glu Val Val Ser Asn Ile Asp Lys Val Gln Met 45
 Leu Leu Tyr Phe Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Ile Glu Ala Ser Leu 60
 Asp Asp His Gln Arg Leu Val Asp Ala Leu Lys Lys Gln Val Asp Val 75
 Ile Ser Ala Leu Ala Gly Val Leu Ser His His Ile Leu Glu Gln 90
 Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 105
 Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Ile Met Glu His Ala Leu 120
 115 125

Gln Pro Gly Ser Ile Thr Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala
130 135 140
Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Met Phe
145 150 155
Ala Gly Tyr Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp Gly His Met Met
165 170 175
Pro Pro Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Gly
180 185 190
Ile Trp Val Asp Glu Asp Asp Val Gly Thr Tyr Thr Ile Lys Ser Ile
195 200 205
Asp Asp Pro Gln Thr Leu Asn Lys Thr Met Tyr Ile Arg Pro Pro Met
210 215 220
Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Val Ile Gln Ile Trp Glu Arg Leu Ser
225 230 235
Glu Gln Asn Leu Asp Lys Ile Tyr Ile Ser Ser Gln Asp Phe Leu Ala
245 250 255
Asp Met Lys Asp Lys Ser Tyr Glu Glu Lys Ile Val Arg Cys His Leu
260 265 270
Tyr Gln Ile Phe Phe Arg Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro
275 280 285
Asn Ala Ile Glu Ala Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Val Thr
290 295 300
Met Asp Ser Tyr Leu Glu Arg Tyr Val
305 310

(2)配列番号63の情報:

(1)配列の特徴:

- (A)長さ:1151塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状

(1)配列の種類:Thujaplicata cDNA PLR-Tp2

- (iii)ハイボセティカル:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (ix)配列の特徴:
 - (A)特徴を表す記号:CDS
 - (B)存在位置:61..996

(xi)配列:配列番号63:

GATAGCAGC ATTCTTCAC CAAATGGTC CCCCATTAA GGAATAGTTT GAAAGCAGC 60
ATC GAA CAC AGT ACC ACG GTT TTG ATA GTG GGA GGC ACA GGA TAC ATA
Met Glu Glu Ser Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile
315 320 325
GGC AGA AGC ATT GTG AAA CCC ACC ATT GCT CTC GGC CAT COT ACT TTC
Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His Pro Thr Phe
330 335 340 345
ATT TTG TTT AGG AAA GAA GTT GTT TCT GAT GTA GAG AAA GTG GAG ATC
Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys Val Glu Met
350 355 360
TTA TTG TCC TTC AAA AAG AAT GGT GCC AAA TTA CTG GAG GCT TCA TTT
Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Phe
365 370 375
GAT GAT CAC GAA AGC CTY GTA GAT GCT GTG AAG CAG GTT GAT GTT GTG
Asp Asp His Glu Ser Leu Val Asp Ala Val Lys Glu Val Asp Val Val
380 385 390
ATA AGT GCA GTT CCA GCA CAC CAC ATG CCG CAT CAC ATC CTT CAA CAG
Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His His Ile Leu Gln Gln
395 400 405
CTC AAA TTA GTG GAG GCC ATT AAA GAA GCT GGA AAT ATT AAG AGG TTT
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe
410 415 420 425
GTT CTT TCA GAA TTT GGG ATG GAT CCA GGG TTA ATG GAG CAT GCA ATG
Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Gly Leu Met Glu His Ala Met
430 435 440
GCA CTT GGC AAC ATT GTA TTT ATT GAT AAA ATA AAA GTT CCA GAG GCC
Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val Arg Glu Ala
445 450 455
ATA GAA GCT GCA TCC ATT CTT CAC ACT TAT ATC TCT GGC AAC ATR TTT
Ile Glu Ala Ala Ser Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala Asn Ile Phe
460 465 470
GCT GGC TAC TTG GTT GGT GGA TTA GCT CAA CTT GGT CCG GTG ATG COT
Ala Gly Tyr Leu Val Gly Glu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Arg Val Met Pro
475 480 485
CCT TCA GAA AAA GTA ATT CTC TAT GCA GAT GCA AAT GTC AAA GCT GTT
Pro Ser Gln Lys Val Ile Leu Tyr Gly Asp Glu Asn Val Lys Ala Val
490 500 505

(2)配列番号65の情報:

(i)配列の特徴:

- (A)長さ:1308塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:Thujia plicata cDNA PLR-1p3
- (iii)ハイボセディカル:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号:CDS
- (B)存在位置:164..1105

(xi)配列:配列番号65:

AAAAACTCTT AGACCTATTT TCATTTTTC CCAGTTCATA AGCTTTTGT GGGTCTCTTC
 AAAAAAGCC CCTCTCGTT AGAGCGAAG ANCGACATGC TCAGATATAT GTAGAGGCA
 AAAAAAGCA AATTGACTG TGAAGTGA TGCACATAG AAT ATG GAT AAG AAG
 Met Asp 315
 AGC AGA GTT CTA ATA GTG GGG GGT ACT GGT TTT ATA GGC AAA AGA ATT
 Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Phe Ile Gly Lys Arg Ile
 320 325
 GTG AAG GCC AGT TTG GCT CTT GGC CAT CCT ACT TAT GTT TTG TTC AGG
 Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Tyr Val Leu Phe Arg
 330 345
 CCA GAA GCC CTC TCT TAC ATT GAC AAA GTG CAG ATG TTG ATA TCC TTC
 Pro Glu Ala Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Val Gln Met Leu Ile Ser Phe
 350 355
 AAA CAG GTT GGG GCC AAA GTT CTT GAG GCT TCA TTG GAT GAC CAC GAA
 Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Leu Asp Asp His Gln
 360 365
 GCG CTT GTG GAT GTT GTC AAA CAA GTA GAT CTT CTC ATC AGT GCT GTT
 Gly Leu Val Asp Val Val Lys Gln Val Asp Val Val Ile Ser Ala Val
 370 385
 TCA GGA GGT GTG GCG CAC CAT ATA CTT GAC CAG CTC AAG CTA GTG
 Ser Gly Gly Leu Val Arg His His Ile Leu Asp Gln Leu Lys Leu Val
 390 405
 CAG GCA ATT AAA GAA GCT GGC AAT ATT AAG AGA TTT CTT CTT TCA GAA
 Glu Ala Ile Lys Glu Ala Cys Arg Phe Phe Leu Pro Ser Glu
 410 425

TTT GGG ATG GAC CCA GAT GTT GTA GAA GAT CCA TTG GAA CTT GCT AAC
 Phe Gly Met Asp Pro Asp Val Val Glu Asp Pro 440
 430
 ATT ACA TTC ATT GAT AAA AGA AAA GTT AGA GGT GCC ATT GAA GCA GCA
 Ile Thr Phe Ile Asp 450
 445
 ACC ATT CCT TAC ACA TAT GTG TCT TCA AAT ATG TTT GCT GGG TTC TTT
 Thr Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asp Met Phe Ala Gly Phe
 460 475
 GCT GGA AGC TTA GCA CAA CTG CAA GAT GCT CCG GCG ATG ATG CCG GCT GCT
 Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Asp Ala Pro Arg Met Met Pro Ala
 480 490
 CCA GAT AAA GTT CTC ATA TAT GGA GAT GGA AAT GTT AAA GCT GTT TAT
 Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Val 505
 495
 GTA GAT CAA GAT GAT GCT GCA ATA TDC ATA CTC AAA TCA ATT GAT GAT
 Val Asp Glu Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Ile Val Lys Ser Ile Asp Asp
 510 520
 CCT GCG ACA CTC AAC AAG ACT GTG TAT ATC AGG CCA CCA ATG AAT ATA
 Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Pro Met Asn Ile
 530 535
 CTT TCA CAG AAA GAA GTA GTT GAA ATA TGG GAG AGA CTA TCA GGT TTG
 Leu Ser Gln Lys Glu Val Val Glu Ile Trp Glu Arg Leu Ser Gly Leu
 540 545
 AGC CTA GAA AAA ATC TAC TCT TCT GAG GAC CAA CTT CTT AAT ATG AAA
 Ser Leu Glu 560
 550
 GAT AAA TCT TAT GTG GAG AAG ATG CCA CCA TGT CAT CTC TAT CAT TTT
 Asp Lys Ser Tyr Val Glu Lys Met Ala Arg Cys His Leu Tyr His Phe
 570 585
 TTT ATC AAA GGG GAT CTT TAC AAT TTT GAA ATT GCA CCC AAT GCT ACT
 Phe Ile Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asn Ala Thr
 590 600
 GAA GCG ACA AAA CTT TAT CCA GAA GTC AAA TAC ACA ACC ATG GAT TCA
 Glu Gly Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr Thr Met Asp Ser
 605 620
 TAT ATG GAG CTT TAT CTA TAGCTATAG ATTCTCTTA AATATAGCT
 Tyr Met Glu Arg Tyr Leu
 625 635
 TGAATATTC TTAATCAT AGAGTGAT TCAATATAA TACACACAC TGTCTCTTT
 ATAGATTAAT TTTTAAAG GTGGCTTTA TAAACATGT ATAAAAAAA TTGAAACAA
 TATTTTAAA TTGCAATTA TAACCACTT TANTAAAAA AAAAAAAA AAA
 1135 1195 1235 1308

(2) 配列番号 66 の情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 314 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(C) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 66:

Met Asp Lys Lys Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Phe Ile 1 10
Gly Lys Arg Ile Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Tyr 20 30
Val Leu Phe Arg Pro Glu Ala Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Val Gln Met 35 40
Leu Ile Ser Phe Lys Gln Leu Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Leu 45 50
Asp Asp His Gln Gly Leu Val Asp Val Val Lys Gln Val Asp Val Val 55 60
Ile Ser Ala Val Ser Gly Gly Leu Val Arg His His Ile Leu Asp Glu 65 70
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 75 80
Leu Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Val Val Glu Asp Pro Leu 85 90
Glu Pro Gly Asn Ile Thr Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala 95 100
Ile Glu Ala Ala Thr Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Met Phe 105 110
Ala Gly Phe Phe Ala Gly Ser Leu Ala Gln Leu Gln Asp Ala Pro Arg 115 120
Met Met Pro Ala Arg Asp Lys Val Leu Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val 125 130
Lys Gly Val Tyr Val Asp Glu Asp Asp Ala Gly Ile Tyr Ile Val Lys 135 140
Ser Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro 145 150
Pro Met Asn Ile Leu Ser Gln Lys Glu Val Val Glu Ile Trp Glu Arg 155 160
225 230 235 240 245

Leu Ser Gly Leu Ser Leu Glu Lys Ile Tyr Val Ser Glu Asp Gln Leu 245 250
Leu Asn Met Lys Asp Lys Ser Tyr Val Glu Lys Met Ala Arg Cys His 255 260
Leu Tyr His Phe Phe Ile Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly 265 270
Pro Asn Ala Thr Glu Gly Thr Lys Leu Tyr Pro Glu Val Lys Tyr Thr 275 280
Thr Met Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 285 290
300 305 310 315

(2) 配列番号 67 の情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1287 塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖の数: 一本鎖
(D) トポロジー: 直鎖状
(ii) 配列の種類: Thuja plicata cDNA PIR-Tp4
(iii) ハイボセシカル: NO
(iv) アンセンス: NO
(ix) 配列の特徴:
(A) 特徴を表す記号: CDS
(B) 存在位置: 11..948

(xi) 配列: 配列番号 67:

GAAGCAGAG ATG GAA GAG AGT AGC AGC ATT TTG GTA GTG GGA GGC ACA 49
Met Glu Glu Ser Ser Arg Ile Leu Val Val Gly Gly Thr 315 320
GGA TAC ATA GGC ACA AGC ATT GTG AAA GCC AGC ATT GCT GTG GGC CAT 97
Gly Tyr Ile Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His 330 335
CCT ACT TTC ATT TTG AGG AAA GAA GTT GTT TCT GAT GTA GAG AAA 145
Pro Thr Phe Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys 345 350 355

GTG GAG ATG TTA TTC TCC AAA AGC GAT GGT GCA TTA CTG GAG 193
Val Glu Met Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu 375
360
GCT TCA TTT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 241
Ala Ser Phe Asp Asp His Glu Ser Leu 385
390
GAT GTT GTC ATA AGT GCA GTT GCA GGA GAC CAC ATG CCG CAT CAC ATC 289
Asp Val Val Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His Ile 405
395
CTT CAA CAG CTC AAA TTA GTG GAG GCC ATT AAA GAA GCT GGA AAT ATT 337
Leu Glu Glu Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala GGA AAT ATT 420
410
AAG AGC TTT GTC CCT TCA GAA TTT GCG ATG GAT CCA GCG TTA ATC GAC 385
Lys Arg Phe Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Gly Leu Met Asp 425
430
CAT GCA ATG GCA CCA GGA GAC ATT GTA TTT ATT GAT AAA ATA AAA GTT 433
His Ala Met Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val 435
440
CGA GAG GCC ATT GAA GCT GCA GCT ATT GCT CAC ACT TAT ATT TCT GCC 461
Arg Glu Ala Ile Glu Ala Ala Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala 470
465
AAT ATA TTT GCT GCG TAC TAC GTT GGT GGA TTA GCT CAA CTT GGT GGT 529
Asn Ile Phe Ala Gly Tyr Leu Val Gly Glu Leu Ala Glu 485
490
GTG ATG GCT TTT TCA GAC AAA GTA TTT CTC TAT GGA GAT GGA AAT GTC 577
Val Met Pro Pro Ser Asp Lys Val Phe Leu Tyr Gly Asp Gly Asn Val 500
495
AAA GCT GTT TCG ATA GAT GAA GAA GAT GTT GGA ATA TAC ACA ATC AAA 625
Lys Ala Val Trp Ile Asp Glu Glu Asp Val Gly Ile Tyr Thr Ile Lys 515
510
GCA ATT GAT GAC CCT CCG ACC CTA AAT MAG ACT GTG TAC ATC AGC CCA 673
Ala Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro 530
535
CCT TTC AAT GAT TTT TCC CAG AAG GAA GTG GTT GAA AAA TGG GAA AAA 721
Pro Leu Asn Val Leu Ser Glu Lys Glu Val Val Glu Lys Trp Glu Lys 545
550
TTA TCA ACA AAG ACC TTG GAT AAA ATA TAT ATG TCT GTT GAG GAT TTT 769
Leu Ser Arg Lys Ser Leu Asp Lys Ile Tyr Met Ser Val Glu Asp Phe 565
570
CTC GCA GGC ATG GAA GGT CAA TCA TAT GGA GAG AAG ATT GGA ATA TCA 817
Leu Ala Gly Met Glu Gly Glu Ser Tyr Gly Glu Lys Ile Gly Ile Ser 580
585
GAT TTC TAT CAG ATG TTC TAT AAG GCG GAT CTT TAT AAT TTT CAA ATT 865
His Phe Tyr Glu Met Phe Tyr Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile 595
590
GGA CCT AAT GGA GTA GAA GCT TCC CAA CTT TAC CCA GGA GTR AAA TAC 913
Gly Pro Asn Gly Val Glu Ala Ser Glu Leu 605
610

ACA ACA GTG GAC TCA TAC ATG GAG CCG TAC CTA TGAATCTT CTTCTGAGAG 966
Thr Thr Val Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu 620
625
AATATTAAAT TCAATTAAAT GCTTTCTAAA AGTTTATAA TTTTGACATA ATGCTAAATA 1026
TACATCTGCA GTATCTAGAT AATAATATTC AATATATAT ATTCTAGAT CAGTTGAGAT 1086
GACTTTTCC CTTTACTGC ATGCTCAACA TATTTATAC AATCTAGCTA ATGCTTTTA 1146
AGGTTGAGAA ACTAATATATG CTTTCTAT ACATGGAAGA ACCATATTT GATATTTCAG 1206
ATTGTAATTA TTTTGATGT TATGATTTTG ATAAATTTTG AAATGATTA TGAATCTT 1266
TTTAAATAAA AAAAAAAAAA A 1287

(2) 配列番号68の情報:

(1) 配列の特徴:

(A)長さ:312アミノ酸

(B)型:アミノ酸

(C)トポロジー:直鎖状

(11)配列の種類:タンパク質

(x1)配列:配列番号68:

Met Glu Glu Ser Ser Arg Ile Leu Val Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile 1
15
Gly Arg Arg Ile Val Lys Ala Ser Ile Ala Leu Gly His Pro Thr Phe 20
25
Ile Leu Phe Arg Lys Glu Val Val Ser Asp Val Glu Lys Val Glu Met 35
40
Leu Leu Ser Phe Lys Lys Asn Gly Ala Lys Leu Leu Glu Ala Ser Phe 50
55
Asp Asp His Glu Ser Leu Val Asp Ala Val Lys Glu Val Asp Val Val 65
70
Ile Ser Ala Val Ala Gly Asn His Met Arg His His Ile Leu Glu Glu 85
90
Leu Lys Leu Val Glu Ala Ile Lys Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe 100
105
Val Pro Ser Glu Phe Gly Met Asp Pro Gly Leu Met Asp His Ala Met 115
120
Ala Pro Gly Asn Ile Val Phe Ile Asp Lys Ile Lys Val Arg Glu Ala 130
135
Ile Glu Ala Ala Ile Pro His Thr Tyr Ile Ser Ala Asn Ile Phe 145
150
155
160

Ala Gly Tyr Leu Val Gly Gly Leu Ala Gln Leu Gly Arg Val Met Pro
165 170 175
Pro Ser Asp Lys Val Phe Leu Tyr Gly Asp Gly Arg Val Lys Ala Val
180 185
Tyr Ile Asp Glu Glu Asp Val Gly Ile Tyr Thr Ile Lys Ala Ile Asp
190 200 205
Asp Pro Arg Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Asn
210 215
Val Leu Ser Gln Lys Glu Val Val Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Ser Arg
220 230 235 240
Lys Ser Leu Asp Lys Ile Tyr Met Ser Val Glu Asp Phe Leu Ala Gly
245 250 255
Met Glu Gly Gln Ser Tyr Gly Glu Lys Ile Gly Ile Ser His Phe Tyr
260 265 270
Gln Met Phe Tyr Lys Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asn
275 280 285
Gly Val Glu Ala Ser Gln Leu Tyr Pro Gly Val Lys Tyr Thr Thr Val
290 295 300
Asp Ser Tyr Met Glu Arg Tyr Leu
305 310

(B) 存在位置 : 2..922

(xi) 配列 : 配列番号 6 9 :

C AGA GTT CTA ATA GTG GGT GGC ACA GCA TAC ATA GGT GCA AAA TTT
Arg Val Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly Arg Lys Phe
315 320 325
GTA AAA GCT AGC TTA GCT CTA GGC CAC CCA ACA TTC GTT TTG TCC AGC
Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gln Gly His Pro Thr Phe Val Leu Ser Arg
330 335 340
CCA GAA GTA GGG TTT GAC ATT GAG GAG GTC CAC ATG TTG CTC TCC TTC
Pro Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val His Met Leu Leu Ser Phe
345 350 355
AAA CAA GCG GGT GGC AGA CTT TTG GAG GGT TCA TTT GAG GAT TTC CAA
Lys Gln Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly Ser Phe Glu Asp Phe
360 365 370 375
AGC CTT GTC GCA GCG TTG AGC CAG GTT GAT GTT GTG AEA AGT GCA GTG
Ser Leu Val Ala Ala Leu Lys Gln Val Asp Val Ile Ser Ala Val
380 385 390
GCA GGA AAC CAT TTC ACA AAC CTT ATA CTT CAA CAG CTT AAA TTG GTG
Ala Gly Asn His Phe Arg Asn Leu Ile Leu Gln Gln Leu Lys Leu Val
395 400 405
GAA GGC ATA AAA GAA GCT GGC AAC ATT AAG AGA TTT CTT TCT GAA
Glu Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu
410 415 420
TTT GCA ATC GAA CCA CAC CTC ATC GAG CAC GCT TTG GAA CTT GGT AAC
Phe Gly Met Glu Pro Asp Leu Met Glu Ala Leu Glu Pro Gly Asn
425 430 435
GCT GTC TTC ATT GAT AAG AGA AAG GTT CCG GCG GCT ATT GAA GCA GCA
Ala Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala
440 445 450 455
GGC ATT CGT TAC AGC TAT GTC TCT TCA AAT ATA TTT GGT GGG TAT TTA
Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Ile Phe Ala Gly Tyr Leu
460 465 470 475
GCA GGA GGG TTG GCA CAA ATT GGC CCG CTT ATG CTT CTT GAT GAA
Ala Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu Met Pro Pro Arg Asp Glu
480 485 490 495
GTA GTT ATC TAT GGT GAT GGT AAC GTT AAA GCT GTT TGG GTC GAC GAA
Val Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val Tyr Val Asp Glu
500 505
GAT GAT GTC GGA ATA TAC ACA CTG AAA ACA ATC GAT GAT CCA CCG ACT
Asp Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr Ile 515
520 525 530 535
CTG AAC AAG ACT GTA TAT ATC AGG CCA CTC AAA AAT ATT CTC TCT CAG
Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Lys Asn Ile Leu Ser Gln
540 545 550 555
AAG GAG CTT CTG GCA AAG TGG GAA AAA CTC TCA GGA AAG TGT TTG AAG
Lys Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Leu Ser Gly Lys Cys Lys
560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995

(2) 配列番号 6 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1282塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 種の数 : 一本鎖

(D) トポロジ : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : Tsuga heterophylla cDNA PLR-Tb1

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(v) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CNS

AAA ACA TAC ATT TCT CCG GAT TTT CTT GCA GCG ATC GAA GAY GAA 766
 Lys Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp Gln 565
 CCT TAC GAA GAT CAG CTC GGA ATA TCT CAC TTC TAT CAA ATC TTT TAC 814
 Pro Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe Tyr 580
 AGT GGA GAT CTC TAT ATT TTT GAG NTT GGG CCA GAC GGT AGA GAA GCA 862
 Ser Gly Asp Leu Tyr Asp Phe Glu Ile Gly Pro 595
 ACA GTG CTA TAC CTT GAA GTT CAA TAC ACT ACC ATG GAT TCT TAT TTG 910
 Thr Val Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr Leu 605
 DAG GCG TAC TTA TACGAGCAT GAGGTTTAT GTTCTACGAC ATGANTCCCA 962
 Lys Arg Tyr Leu
 CGGAAATAC CAGAAATCTT CATTGAGAT CAAATATGCG ATAAATATTT CAGCTATAT 1022
 TCCATCAGAA ATACAGAAA TTCTATACG AGTTCAATTA ATGGATATAT ATCTATAT 1082
 TTATGTTTAA TTATCGAAA TAGGCTGGA CGAATGAT ATATATCAT CTGATGGA 1142
 CGGCAAGGTT GTAAATGCG AAGCTGTACA GTATATCAT CTGTGCGCA AAGCTACTA 1202
 TATCATATTA ACTGATGGA AAGTTTACA TTTCCTATTA ACTATGCTTG AATTTTAT 1262
 TACAAATTA AAAAAAAAA 1282

(2) 配列番号 70 の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 307アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 70:

Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly Arg Lys Phe Val 1
 Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Phe Val Leu Ser Arg Pro 20
 Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val His Met Leu Leu Ser Phe Lys 35
 Gln Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly Ser Phe Glu Asp Phe Gln Ser 50
 Leu Val Ala Ala Leu Lys Gln Val Asp Val Ile Ser Ala Val Ala 65

Gly Asn His Phe Arg Asn Leu Ile Leu Gln Gln Leu Lys Leu Val Glu 85
 Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser Glu Phe 100
 Gly Met Glu Pro Asp Leu Met Glu His Ala Leu Glu Pro Gly Asn Ala 115
 Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Ala Gly 130
 Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Ile Phe Ala Gly Tyr Leu Ala 145
 Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu Met Pro Pro Arg Asp Glu Val 165
 Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val Trp Val Asp Glu Asp 180
 Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr Ile Asp Asp Pro Arg Thr Leu 195
 Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Lys Asn Ile Leu Ser Gln Lys 210
 Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Leu Ser Gly Lys Cys Leu Lys Lys 225
 Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp Glu Pro 245
 Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe Tyr Ser 260
 Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Glu Ala Thr 275
 Val Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr Leu Lys 290
 Arg Tyr Leu 305

(2) 配列番号 71 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1328塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Tsuga heterophylla cDNA PLR-Th2

(iii) ハイボテシカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(ii) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 20..946

(ii) 配列: 配列番号 71:

GAATTCGCA CAGCTAC AGC AGC AGC CTT CTA ATA GTG GGT GGC ACA GGA 52
Met Ser Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gln
310 313 316 319 322 325 328 331 334 337 340 343 346 349 352 355 358 361 364 367 370 373 376 379 382 385 388 391 394 397 400 403 406 409 412 415 418 421 424 427 430 433 436 439 442 445 448 451 454 457 460 463 466 469 472 475 478 481 484 487 490 493 496 499 502 505 508 511 514 517 520 523 526 529 532 535 538 541 544 547 550 553 556 559 562 565 568 571 574 577 580 583 586 589 592 595 598 601 604 607 610 613 616 619 622 625 628 631 634 637 640 643 646 649 652 655 658 661 664 667 670 673 676 679 682 685 688 691 694 697 700 703 706 709 712 715 718 721 724 727 730 733 736 739 742 745 748 751 754 757 760 763 766 769 772 775 778 781 784 787 790 793 796 799 802 805 808 811 814 817 820 823 826 829 832 835 838 841 844 847 850 853 856 859 862 865 868 871 874 877 880 883 886 889 892 895 898 901 904 907 910 913 916 919 922 925 928 931 934 937 940 943 946 949 952 955 958 961 964 967 970 973 976 979 982 985 988 991 994 997 1000 1003 1006 1009 1012 1015 1018 1021 1024 1027 1030 1033 1036 1039 1042 1045 1048 1051 1054 1057 1060 1063 1066 1069 1072 1075 1078 1081 1084 1087 1090 1093 1096 1099 1102 1105 1108 1111 1114 1117 1120 1123 1126 1129 1132 1135 1138 1141 1144 1147 1150 1153 1156 1159 1162 1165 1168 1171 1174 1177 1180 1183 1186 1189 1192 1195 1198 1201 1204 1207 1210 1213 1216 1219 1222 1225 1228 1231 1234 1237 1240 1243 1246 1249 1252 1255 1258 1261 1264 1267 1270 1273 1276 1279 1282 1285 1288 1291 1294 1297 1300 1303 1306 1309 1312 1315 1318 1321 1324 1327 1330 1333 1336 1339 1342 1345 1348 1351 1354 1357 1360 1363 1366 1369 1372 1375 1378 1381 1384 1387 1390 1393 1396 1399 1402 1405 1408 1411 1414 1417 1420 1423 1426 1429 1432 1435 1438 1441 1444 1447 1450 1453 1456 1459 1462 1465 1468 1471 1474 1477 1480 1483 1486 1489 1492 1495 1498 1501 1504 1507 1510 1513 1516 1519 1522 1525 1528 1531 1534 1537 1540 1543 1546 1549 1552 1555 1558 1561 1564 1567 1570 1573 1576 1579 1582 1585 1588 1591 1594 1597 1600 1603 1606 1609 1612 1615 1618 1621 1624 1627 1630 1633 1636 1639 1642 1645 1648 1651 1654 1657 1660 1663 1666 1669 1672 1675 1678 1681 1684 1687 1690 1693 1696 1699 1702 1705 1708 1711 1714 1717 1720 1723 1726 1729 1732 1735 1738 1741 1744 1747 1750 1753 1756 1759 1762 1765 1768 1771 1774 1777 1780 1783 1786 1789 1792 1795 1798 1801 1804 1807 1810 1813 1816 1819 1822 1825 1828 1831 1834 1837 1840 1843 1846 1849 1852 1855 1858 1861 1864 1867 1870 1873 1876 1879 1882 1885 1888 1891 1894 1897 1900 1903 1906 1909 1912 1915 1918 1921 1924 1927 1930 1933 1936 1939 1942 1945 1948 1951 1954 1957 1960 1963 1966 1969 1972 1975 1978 1981 1984 1987 1990 1993 1996 1999 2002 2005 2008 2011 2014 2017 2020 2023 2026 2029 2032 2035 2038 2041 2044 2047 2050 2053 2056 2059 2062 2065 2068 2071 2074 2077 2080 2083 2086 2089 2092 2095 2098 2101 2104 2107 2110 2113 2116 2119 2122 2125 2128 2131 2134 2137 2140 2143 2146 2149 2152 2155 2158 2161 2164 2167 2170 2173 2176 2179 2182 2185 2188 2191 2194 2197 2200 2203 2206 2209 2212 2215 2218 2221 2224 2227 2230 2233 2236 2239 2242 2245 2248 2251 2254 2257 2260 2263 2266 2269 2272 2275 2278 2281 2284 2287 2290 2293 2296 2299 2302 2305 2308 2311 2314 2317 2320 2323 2326 2329 2332 2335 2338 2341 2344 2347 2350 2353 2356 2359 2362 2365 2368 2371 2374 2377 2380 2383 2386 2389 2392 2395 2398 2401 2404 2407 2410 2413 2416 2419 2422 2425 2428 2431 2434 2437 2440 2443 2446 2449 2452 2455 2458 2461 2464 2467 2470 2473 2476 2479 2482 2485 2488 2491 2494 2497 2500 2503 2506 2509 2512 2515 2518 2521 2524 2527 2530 2533 2536 2539 2542 2545 2548 2551 2554 2557 2560 2563 2566 2569 2572 2575 2578 2581 2584 2587 2590 2593 2596 2599 2602 2605 2608 2611 2614 2617 2620 2623 2626 2629 2632 2635 2638 2641 2644 2647 2650 2653 2656 2659 2662 2665 2668 2671 2674 2677 2680 2683 2686 2689 2692 2695 2698 2701 2704 2707 2710 2713 2716 2719 2722 2725 2728 2731 2734 2737 2740 2743 2746 2749 2752 2755 2758 2761 2764 2767 2770 2773 2776 2779 2782 2785 2788 2791 2794 2797 2800 2803 2806 2809 2812 2815 2818 2821 2824 2827 2830 2833 2836 2839 2842 2845 2848 2851 2854 2857 2860 2863 2866 2869 2872 2875 2878 2881 2884 2887 2890 2893 2896 2899 2902 2905 2908 2911 2914 2917 2920 2923 2926 2929 2932 2935 2938 2941 2944 2947 2950 2953 2956 2959 2962 2965 2968 2971 2974 2977 2980 2983 2986 2989 2992 2995 2998 3001 3004 3007 3010 3013 3016 3019 3022 3025 3028 3031 3034 3037 3040 3043 3046 3049 3052 3055 3058 3061 3064 3067 3070 3073 3076 3079 3082 3085 3088 3091 3094 3097 3100 3103 3106 3109 3112 3115 3118 3121 3124 3127 3130 3133 3136 3139 3142 3145 3148 3151 3154 3157 3160 3163 3166 3169 3172 3175 3178 3181 3184 3187 3190 3193 3196 3199 3202 3205 3208 3211 3214 3217 3220 3223 3226 3229 3232 3235 3238 3241 3244 3247 3250 3253 3256 3259 3262 3265 3268 3271 3274 3277 3280 3283 3286 3289 3292 3295 3298 3301 3304 3307 3310 3313 3316 3319 3322 3325 3328 3331 3334 3337 3340 3343 3346 3349 3352 3355 3358 3361 3364 3367 3370 3373 3376 3379 3382 3385 3388 3391 3394 3397 3400 3403 3406 3409 3412 3415 3418 3421 3424 3427 3430 3433 3436 3439 3442 3445 3448 3451 3454 3457 3460 3463 3466 3469 3472 3475 3478 3481 3484 3487 3490 3493 3496 3499 3502 3505 3508 3511 3514 3517 3520 3523 3526 3529 3532 3535 3538 3541 3544 3547 3550 3553 3556 3559 3562 3565 3568 3571 3574 3577 3580 3583 3586 3589 3592 3595 3598 3601 3604 3607 3610 3613 3616 3619 3622 3625 3628 3631 3634 3637 3640 3643 3646 3649 3652 3655 3658 3661 3664 3667 3670 3673 3676 3679 3682 3685 3688 3691 3694 3697 3700 3703 3706 3709 3712 3715 3718 3721 3724 3727 3730 3733 3736 3739 3742 3745 3748 3751 3754 3757 3760 3763 3766 3769 3772 3775 3778 3781 3784 3787 3790 3793 3796 3799 3802 3805 3808 3811 3814 3817 3820 3823 3826 3829 3832 3835 3838 3841 3844 3847 3850 3853 3856 3859 3862 3865 3868 3871 3874 3877 3880 3883 3886 3889 3892 3895 3898 3901 3904 3907 3910 3913 3916 3919 3922 3925 3928 3931 3934 3937 3940 3943 3946 3949 3952 3955 3958 3961 3964 3967 3970 3973 3976 3979 3982 3985 3988 3991 3994 3997 4000 4003 4006 4009 4012 4015 4018 4021 4024 4027 4030 4033 4036 4039 4042 4045 4048 4051 4054 4057 4060 4063 4066 4069 4072 4075 4078 4081 4084 4087 4090 4093 4096 4099 4102 4105 4108 4111 4114 4117 4120 4123 4126 4129 4132 4135 4138 4141 4144 4147 4150 4153 4156 4159 4162 4165 4168 4171 4174 4177 4180 4183 4186 4189 4192 4195 4198 4201 4204 4207 4210 4213 4216 4219 4222 4225 4228 4231 4234 4237 4240 4243 4246 4249 4252 4255 4258 4261 4264 4267 4270 4273 4276 4279 4282 4285 4288 4291 4294 4297 4300 4303 4306 4309 4312 4315 4318 4321 4324 4327 4330 4333 4336 4339 4342 4345 4348 4351 4354 4357 4360 4363 4366 4369 4372 4375 4378 4381 4384 4387 4390 4393 4396 4399 4402 4405 4408 4411 4414 4417 4420 4423 4426 4429 4432 4435 4438 4441 4444 4447 4450 4453 4456 4459 4462 4465 4468 4471 4474 4477 4480 4483 4486 4489 4492 4495 4498 4501 4504 4507 4510 4513 4516 4519 4522 4525 4528 4531 4534 4537 4540 4543 4546 4549 4552 4555 4558 4561 4564 4567 4570 4573 4576 4579 4582 4585 4588 4591 4594 4597 4600 4603 4606 4609 4612 4615 4618 4621 4624 4627 4630 4633 4636 4639 4642 4645 4648 4651 4654 4657 4660 4663 4666 4669 4672 4675 4678 4681 4684 4687 4690 4693 4696 4699 4702 4705 4708 4711 4714 4717 4720 4723 4726 4729 4732 4735 4738 4741 4744 4747 4750 4753 4756 4759 4762 4765 4768 4771 4774 4777 4780 4783 4786 4789 4792 4795 4798 4801 4804 4807 4810 4813 4816 4819 4822 4825 4828 4831 4834 4837 4840 4843 4846 4849 4852 4855 4858 4861 4864 4867 4870 4873 4876 4879 4882 4885 4888 4891 4894 4897 4900 4903 4906 4909 4912 4915 4918 4921 4924 4927 4930 4933 4936 4939 4942 4945 4948 4951 4954 4957 4960 4963 4966 4969 4972 4975 4978 4981 4984 4987 4990 4993 4996 4999 5002 5005 5008 5011 5014 5017 5020 5023 5026 5029 5032 5035 5038 5041 5044 5047 5050 5053 5056 5059 5062 5065 5068 5071 5074 5077 5080 5083 5086 5089 5092 5095 5098 5101 5104 5107 5110 5113 5116 5119 5122 5125 5128 5131 5134 5137 5140 5143 5146 5149 5152 5155 5158 5161 5164 5167 5170 5173 5176 5179 5182 5185 5188 5191 5194 5197 5200 5203 5206 5209 5212 5215 5218 5221 5224 5227 5230 5233 5236 5239 5242 5245 5248 5251 5254 5257 5260 5263 5266 5269 5272 5275 5278 5281 5284 5287 5290 5293 5296 5299 5302 5305 5308 5311 5314 5317 5320 5323 5326 5329 5332 5335 5338 5341 5344 5347 5350 5353 5356 5359 5362 5365 5368 5371 5374 5377 5380 5383 5386 5389 5392 5395 5398 5401 5404 5407 5410 5413 5416 5419 5422 5425 5428 5431 5434 5437 5440 5443 5446 5449 5452 5455 5458 5461 5464 5467 5470 5473 5476 5479 5482 5485 5488 5491 5494 5497 5500 5503 5506 5509 5512 5515 5518 5521 5524 5527 5530 5533 5536 5539 5542 5545 5548 5551 5554 5557 5560 5563 5566 5569 5572 5575 5578 5581 5584 5587 5590 5593 5596 5599 5602 5605 5608 5611 5614 5617 5620 5623 5626 5629 5632 5635 5638 5641 5644 5647 5650 5653 5656 5659 5662 5665 5668 5671 5674 5677 5680 5683 5686 5689 5692 5695 5698 5701 5704 5707 5710 5713 5716 5719 5722 5725 5728 5731 5734 5737 5740 5743 5746 5749 5752 5755 5758 5761 5764 5767 5770 5773 5776 5779 5782 5785 5788 5791 5794 5797 5800 5803 5806 5809 5812 5815 5818 5821 5824 5827 5830 5833 5836 5839 5842 5845 5848 5851 5854 5857 5860 5863 5866 5869 5872 5875 5878 5881 5884 5887 5890 5893 5896 5899 5902 5905 5908 5911 5914 5917 5920 5923 5926 5929 5932 5935 5938 5941 5944 5947 5950 5953 5956 5959 5962 5965 5968 5971 5974 5977 5980 5983 5986 5989 5992 5995 5998 6001 6004 6007 6010 6013 6016 6019 6022 6025 6028 6031 6034 6037 6040 6043 6046 6049 6052 6055 6058 6061 6064 6067 6070 6073 6076 6079 6082 6085 6088 6091 6094 6097 6100 6103 6106 6109 6112 6115 6118 6121 6124 6127 6130 6133 6136 6139 6142 6145 6148 6151 6154 6157 6160 6163 6166 6169 6172 6175 6178 6181 6184 6187 6190 6193 6196 6199 6202 6205 6208 6211 6214 6217 6220 6223 6226 6229 6232 6235 6238 6241 6244 6247 6250 6253 6256 6259 6262 6265 6268 6271 6274 6277 6280 6283 6286 6289 6292 6295 6298 6301 6304 6307 6310 6313 6316 6319 6322 6325 6328 6331 6334 6337 6340 6343 6346 6349 6352 6355 6358 6361 6364 6367 6370 6373 6376 6379 6382 6385 6388 6391 6394 6397 6400 6403 6406 6409 6412 6415 6418 6421 6424 6427 6430 6433 6436 6439 6442 6445 6448 6451 6454 6457 6460 6463 6466 6469 6472 6475 6478 6481 6484 6487 6490 6493 6496 6499 6502 6505 6508 6511 6514 6517 6520 6523 6526 6529 6532 6535 6538 6541 6544 6547 6550 6553 6556 6559 6562 6565 6568 6571 6574 6577 6580 6583 6586 6589 6592 6595 6598 6601 6604 6607 6610 6613 6616 6619 6622 6625 6628 6631 6634 6637 6640 6643 6646 6649 6652 6655 6658 6661 6664 6667 6670 6673 6676 6679 6682 6685 6688 6691 6694 6697 6700 6703 6706 6709 6712 6715 6718 6721 6724 6727 6730 6733 6736 6739 6742 6745 6748 6751 6754 6757 6760 6763 6766 6769 6772 6775 6778 6781 6784 6787 6790 6793 6796 6799 6802 6805 6808 6811 6814 6817 6820 6823 6826 6829 6832 6835 6838 6841 6844 6847 6850 6853 6856 6859 6862 6865 6868 6871 6874 6877 6880 6883 6886 6889 6892 6895 6898 6901 6904 6907 6910 6913 6916 6919 6922 6925 6928 6931 6934 6937 6940 6943 6946 6949 6952 6955 6958 6961 6964 6967 6970 6973 6976 6979 6982 6985 6988 6991 6994 6997 7000 7003 7006 7009 7012 7015 7018 7021 7024 7027 7030 7033 7036 7039 7042 7045 7048 7051 7054 7057 7060 7063 7066 7069 7072 7075 7078 7081 7084 7087 7090 7093 7096 7099 7102 7105 7108 7111 7114 7117 7120 7123 7126 7129 7132 7135 7138 7141 7144 7147 7150 7153 7156 7159 7162 7165 7168 7171 7174 7177 7180 7183 7186 7189 7192 7195 7198 7201 7204 7207 7210 7213 7216 7219 7222 7225 7228 7231 7234 7237 7240 7243 7246 7249 7252 7255 7258 7261 7264 7267 7270 7273 7276 7279 7282 7285 7288 7291 7294 7297 7300 7303 7306 7309 7312 7315 7318 7321 7324 7327 7330 7333 7336 7339 7342 7345 7348 7351 7354 7357 7360 7363 7366 7369 7372 7375 7378 7381 7384 7387 7390 7393 7396 7399 7

(xi) 配列：配列番号72：

Met Ser Arg Val Leu Ile Val Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly Arg Lys
1 5 10 15
Phe Val Lys Ala Ser Leu Ala Leu Gly His Pro Thr Phe Val Leu Ser
20 25 30
Arg Pro Glu Val Gly Phe Asp Ile Glu Lys Val His Met Leu Ser
35 40 45
Phe Lys Gln Ala Gly Ala Arg Leu Leu Glu Gly Ser Phe Glu Asp Phe
50 55 60
Gln Ser Leu Val Ala Ala Leu Lys Gln Val Asp Val Val Ile Ser Ala
65 70 75 80
Val Ala Gly Asn His Phe Arg Asn Leu Ile Leu Gln Gln Lys Lys
85 90 95
Val Glu Ala Ile Lys Glu Ala Arg Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro Ser
100 105 110
Glu Phe Gly Met Asp Pro Asp Leu Met Glu His Ala Leu Glu Pro Gly
115 120 125
Asn Ala Val Phe Ile Asp Lys Arg Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala
130 135 140
Ala Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Ile Phe Ala Gly Tyr
145 150 155 160
Leu Ala Gly Gly Leu Ala Gln Ile Gly Arg Leu Met Pro Pro Arg Asp
165 170 175
Glu Val Val Ile Tyr Gly Asp Gly Asn Val Lys Ala Val Trp Val Asp
180 185 190
Glu Asp Asp Val Gly Ile Tyr Thr Leu Lys Thr Ile Asp Asp Pro Arg
195 200 205
Thr Leu Asn Lys Thr Val Tyr Ile Arg Pro Leu Lys Asn Ile Leu Ser
210 215 220
Gln Lys Glu Leu Val Ala Lys Trp Glu Lys Leu Ser Gly Lys Phe Leu
225 230 235 240
Lys Lys Thr Tyr Ile Ser Ala Glu Asp Phe Leu Ala Gly Ile Glu Asp
245 250 255
Gln Pro Tyr Glu His Gln Val Gly Ile Ser His Phe Tyr Gln Met Phe
260 265 270
Tyr Ser Gly Asp Leu Tyr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Glu
275 280 285

Ala Thr Met Leu Tyr Pro Glu Val Gln Tyr Thr Thr Met Asp Ser Tyr
290 295 300

Leu Lys Arg Tyr Leu
305

(2) 配列番号73の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：358塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：Forsythia intermedia樹液タンパク質cDNAクローンを単離する
るために使用されるcDNAプローブ

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号73：

AAGGAGTGG TGTCTACTT CCACGACATA CTITTCANAG GGGNATATA CACGATGCC 60
ACTGCGACCA TAGTCGGGTC CCCCACATGG GGCACACAGA CTGCATGGC GGTCCCATTC 120
AATTTTGGTG ACTAATGGT GTTCGACGAT CCATTTACTT TAGACACAGA TCTCCATTC 180
CCCCCATGG GTCCGGCACA AGGCACTGAC TTCTATGATC AAAAAAGTAC ATACATGCT 240
TGGCTGGGT TCTCATTTT GTTCAATTC ACTATGATG TTGGACCTT GACTTTGCT 300
GGGGCTGATC CATTTGTGAA CAGAGCTAGG GAGGTATCAG TCATTTGGTG AACCA 355

(2) 配列番号74の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 記載：PCRプライマーR20J

(iii) ハイボセティカル：NO

(xi) 配列：配列番号74：

CAGCATGAC CATGATGCG

20

(2) 配列番号75の情報：

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：19塩基対
 - (B) 型：核酸
 - (C) 鎖の数：一本鎖
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：他の核酸
- (A) 記載：[PCRプライマー-U19]
- (ii) ハイボセティカル：NO

(xi) 配列：配列番号75：

GTATTCGAG TCACGAGGT

19

(2) 配列番号76の情報：

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：6アミノ酸
 - (B) 型：アミノ酸
 - (C) 鎖の数：関連なし
 - (D) トポロジー：関連なし
- (ii) 配列の種類：ペプチド (NADPH 結合モチーフ)
- (ii) ハイボセティカル：NO
- (v) フラグメント型：内部

(xi) 配列：配列番号76：

Gly Xaa Gly Xaa Xaa Gly

1 5

【図1】

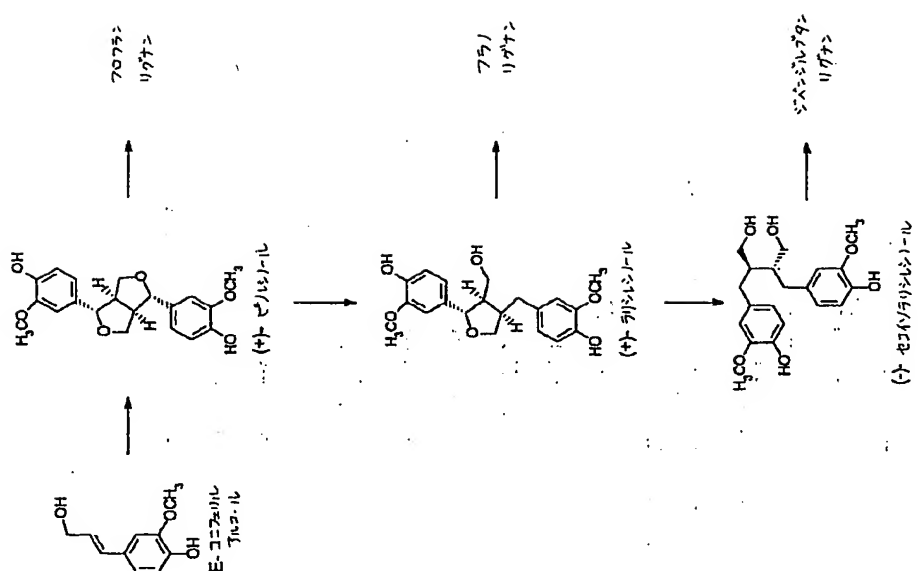


Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.